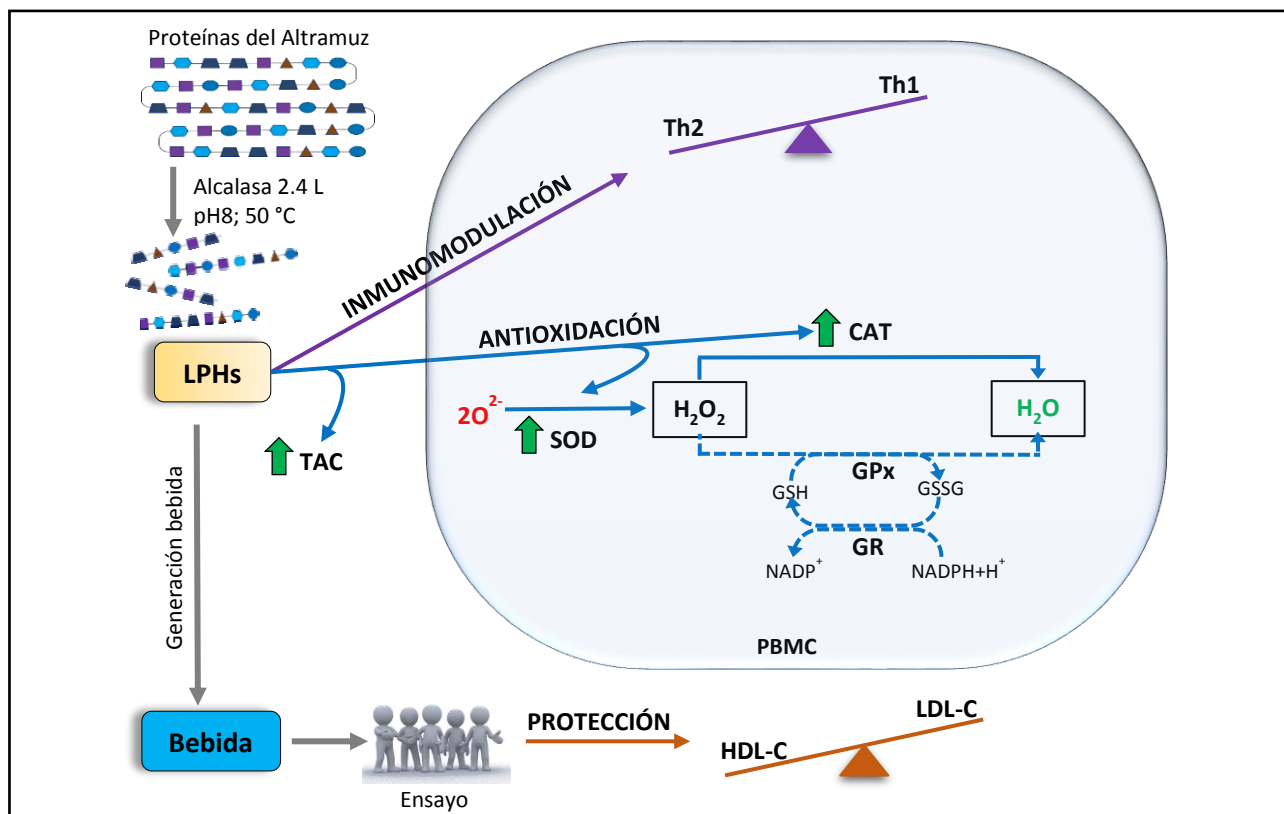


## Tesis Doctoral

# Valoración de los efectos saludables de péptidos bioactivos vegetales: efectos inmunomoduladores, antioxidantes y metabólicos



IVÁN CRUZ CHAMORRO

Sevilla, 2018





**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INMUNOLOGÍA



**INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA**

LABORATORIO DE  
NEUROINMUNOENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

# **VALORACIÓN DE LOS EFECTOS SALUDABLES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS VEGETALES: EFECTOS INMUNOMODULADORES, ANTIOXIDANTES Y METABÓLICOS**

Tesis Doctoral presentada por **D. IVÁN CRUZ CHAMORRO**  
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 2018



**D. ANTONIO CARRILLO VICO**, Doctor en Biología, Profesor titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Valoración de los efectos saludables de péptidos bioactivos vegetales: efectos inmunomoduladores, antioxidantes y metabólicos” realizada por **D. IVÁN CRUZ CHAMORRO**, ha sido llevada a cabo bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

En Sevilla, a 3 de septiembre de 2018

Vº Bº del Director



Fdo.: Dr. Antonio Carrillo Vico

El Doctorando



Fdo.: D. Iván Cruz Chamorro



***A la me nuneta***

**[A mi abuelita]**





## **AGRADECIMIENTOS**

Como es sabido, el desarrollo de la tesis doctoral es un trabajo que requiere mucho tiempo, muchos esfuerzos y muchos sacrificios.

Es una labor personal, que cada uno de nosotros ha de trabajar. Aun así, no sería posible llegar a conseguir esta meta sin que haya personas a nuestro lado que nos apoyen, nos ayuden y nos enseñen.

Por este motivo, agradecer a toda esa gente que siempre ha estado junto a mí (físicamente y espiritualmente) sería una tarea interminable. Cada persona que he encontrado en este largo camino de mi vida ha sabido transmitirme algo, algo que ha hecho posible la persona que soy, con mis méritos y mis defectos.

Me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Antonio Carrillo Vico, que desde un primer momento confió en mí, me apoyó, me dio la oportunidad de volver a Sevilla para desarrollar la tesis doctoral y especialmente agradecerle por todo lo que ha sabido enseñarme durante todos estos años y por seguir confiando en mí. Espero que podamos seguir investigando juntos muchos años más.

A mi segunda directora de tesis, aunque no burocráticamente, la Dra. Nuria Álvarez Sánchez, un hito para el lab. 210. Siempre disponible a resolver cualquier duda y a enseñarte cosas nuevas, gran compañera de trabajo y gran maestra. Un ejemplo a seguir por su gran dedicación y pasión. Los dos nos

soportamos mutuamente, pero el respeto y la estima pueden con todo. Unas miradas y ya sabemos que es lo que nos pasa por la cabeza.

A la Dra. Patricia Judith Lardone, una persona siempre con la sonrisa en el rostro y que nos trae alegría y tranquilidad.

A todos los del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología, y en particular al Dr. Juan Miguel Guerrero, un referente para todos nosotros y a la Dra. Patrocinio Molinero, sin la cual este viaje nunca habría empezado.

A los Dres. Justo Pedroche, Francisco Millán y Cecilio Carrera Sánchez por esta colaboración tan productiva.

A todos los técnicos del Instituto, por su gran labor, desde los de limpieza y esterilización hasta todos los técnicos del servicio de producción y experimentación animal, en particular a la directora de este, la Dra. Cristina Pichardo.

También a los de seguridad, por preservar la seguridad del edificio; a los de limpieza, por dejar cada día brillante nuestro Instituto; a los de mantenimiento, siempre disponibles en encontrar soluciones a cualquier

problema y a Francis por encargarse de los envíos y las llegadas de material y correos.

A mis nuevos compañeros, aunque hayan llegado un poco tarde. Un año pasa rápido, sí, pero ha sido un año bastante intenso. Gracias por los buenos momentos pasados juntos y por haber traído un poco de movida al 210.

A Ana Isabel Álvarez López, por aguantarme tanto y por hacerme reír cada día. Somos como el “perro y el gato”, como dice Nuria, pero nos une una gran amistad.

A nuestro “pollito descabezado”, Guillermo Santos Sánchez, con tus estampitas, tus miles de ratones que canular y, sobre todo, tu buen corazón.

A Alicia Martínez López, la compañera con más antigüedad, se puede decir que te vi crecer jajaja. Te deseo mucha suerte en tu futuro.

A Beatriz Rodríguez Ortiz, por tus pequeñas locuras y por tu alegría.

A Andrés Fernández Rodríguez, un buen amigo, por acompañarme en esos desayunos durante los años que estuviste aquí, a esos días de semana santa, por dejarme conocer a María y tu hogar. Estoy muy feliz de que hayas conseguido lo que te propusiste.

A Ana Álvarez Ríos, por aguantarme durante todos estos años con mis peticiones y por ayudarme con las miles de muestras de los voluntarios del ensayo. Siempre me alegra verte, tienes una buena energía.

A Francisco, mi compañero de piso preferido que durante todos estos años ha sabido aguantarme. Eres una gran persona Fran y un gran amigo. Hemos compartido muchas cosas y espero seguir compartiendo muchos años más. Eres un gran cocinero y puedes lograr muchas cosas en tu vida, solo necesitas confiar más en ti y lanzarte. Lo conseguirás.

A Miguel Linde, mi productor, compositor, cantante [...] preferido. Gracias por brindarme tu amistad y por hacerme sentir parte de tu familia. Que, por cierto, tienes una familia preciosa. Estoy muy orgulloso de tus logros y espero seguir viendo de cerca lo que conseguirás en estos años con todos tus esfuerzos.

A Julián que tanto me aguanta. Eres una persona muy buena y con un gran corazón. Desconoces la gran fuerza que tienes dentro. Espero poder ayudarte a conseguir tus objetivos.

A todos mis amigos, tanto los que viven en España, como los que viven en Italia, o en algún país del mundo. Sería verdaderamente imposible hablar

de cada uno de vosotros. Pero creo que ya sabéis lo que pienso y lo mucho que os agradezco todo.

A la Dra. Linda Palma que siempre ha confiado en mí y me ha apoyado en este camino.

A mi familia.

A mi madre María, “la africana”, la que me ha ensañado a estar en este mundo y a vivir las cosas bajo otro punto de vista. No hay palabras suficientes para expresar toda la gratitud que te tengo. Solo digo GRACIAS. Así como se lo hago llegar a mi padre Miguel, por su puesto. Él ya lo sabe todo, no se le puede esconder nada. Gracias por protegerme.

A mi hermano Alejandro, que siempre me apoya y me defiende haga lo que haga. Estoy muy orgulloso de ti *fratello*.

¡GRACIAS A TODOS!



Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación de las siguientes instituciones y proyectos de investigación:

**A. Beca/contrato predoctoral:**

Contrato FPU del plan de formación de doctores del programa nacional de formación de profesorado universitario de la convocatoria 2013

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Referencia: FPU13/01210

Duración: 20/09/2014 - 19/09/2018

Director del contrato FPU: Antonio Carrillo Vico

**B. Proyectos de Investigación:**

Título: Valoración de los efectos saludables de péptidos bioactivos vegetales: efectos inmunomoduladores, antioxidantes y metabólicos.

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Referencia: AGL2012-40247-C02-02

Presupuesto concedido: 87.750 €

Duración: 01/01/2013 - 31/12/2015

Investigador principal: Antonio Carrillo Vico

Título: Valoración Funcional de Los Efectos Beneficiosos de Biopéptidos de Origen Vegetal en la Aterosclerosis y el Síndrome Metabólico

Entidad financiadora: Consejería de Salud. Junta de Andalucía

Referencia: PC-0111-2016-0111

Presupuesto concedido: 96.000 €

Duración: 21/12/2016 - 20/12/2019

Investigador principal: Antonio Carrillo Vico





GRX CATIFENALP  
GOLD-CYSH  
ACEZOLIC  
WOPMIS  
IMCHUVA  
EQVIAO PHA  
GPTGO SOD

## ABREVIATURAS

---



<b>•OH</b>	Radical Hidroxilo
<b>ACE</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina I
<b>ALP</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>ECV</b>	Enfermedades Cardiovasculares
<b>FA</b>	Fase Acuosa
<b>FO</b>	Fase Oleosa
<b>GGT</b>	$\gamma$ -Glutamil-Transferasa
<b>GOT</b>	Transaminasa Glutámico-Oxalacética
<b>GPT</b>	Transaminasa Glutámico Pirúvica
<b>GPx</b>	Glutación Peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación Reductasa
<b>GSH</b>	Glutación Reducido
<b>GSSG</b>	Glutación Oxidado
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogeno
<b>HDL-C</b>	Lipoproteínas de Alta Densidad de Colesterol
<b>HUVR</b>	Hospital Universitario Virgen del Rocío
<b>IBiS</b>	Instituto de Biomedicina de Sevilla
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón- $\gamma$
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina, Citoquina
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>LDL-C</b>	Lipoproteínas de Baja Densidad de Colesterol

<b>LPHs</b>	Hidrolizados de Altramuz
<b>M<math>\phi</math></b>	Macrófagos
<b>M<math>\phi</math>-THP-1</b>	Macrófagos derivados de la línea THP-1
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical Superóxido
<b>PBMCs</b>	Células Mononucleares de Sangre Periférica
<b>PCR</b>	Proteína C Reactiva
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina-P
<b>SF-36</b>	Cuestionario Short Form-36
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>TAC</b>	Capacidad Antioxidante Total
<b>TC</b>	Colesterol Total
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral

## RESUMEN

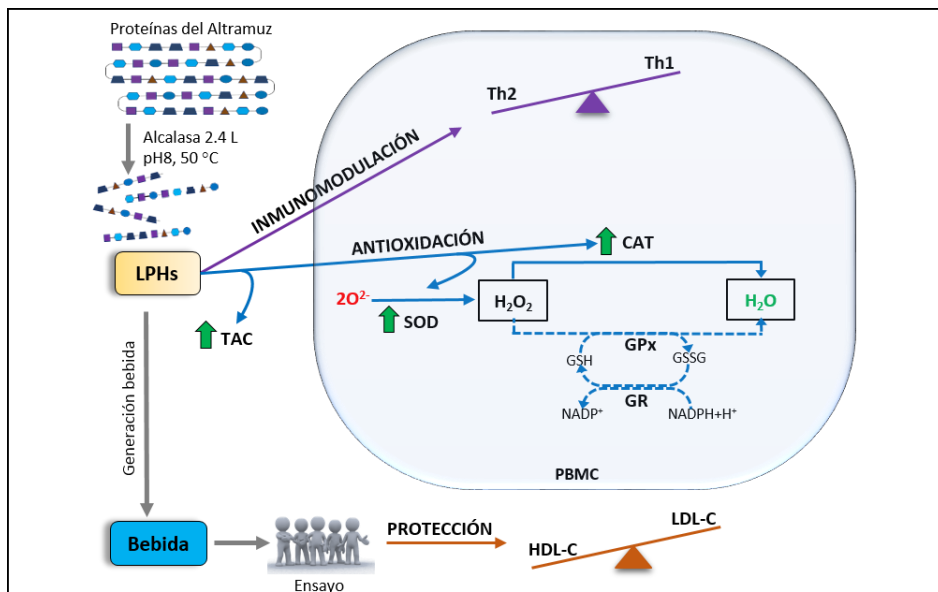
El uso de péptidos bioactivos, procedentes de los alimentos, es un nuevo hallazgo en el campo de la nutrición. El objetivo último del uso de estos péptidos es modular las funciones biológicas y tratar, prevenir o reducir el riesgo de enfermedad. La hidrólisis enzimática es uno de los métodos más utilizados para la obtención de estos péptidos, debido al mantenimiento del valor nutricional de la proteína de origen y a la falta de formación de compuestos indeseables.

En este estudio hemos evaluados si la administración *in vitro* de péptidos procedentes de los aislados proteicos de altramuza (LPHs), obtenidos utilizando la endopeptidasa Alcalasa 2.4 L, ejercen un efecto inmunomodulador y antioxidante sobre células de sangre periférica humana (PBMCs) de voluntarios sanos. Tras evaluar que estos péptidos redujeron la proliferación celular sin ejercer ningún efecto citotóxico, se estudiaron la producción de citoquinas pro- y antiinflamatorias y la expresión génica y actividad de enzimas clave implicadas en la prevención del estrés oxidativo. Los LPHs disminuyeron la respuesta Th1, aumentando el balance Th2/Th1 y, además, aumentaron la capacidad antioxidante total de las PBMCs a través del aumento en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.

Estos hallazgos nos llevaron a formular una bebida experimental basada en estos hidrolizados, para evaluar *in vivo*, a través de un ensayo alimentario en voluntarios sanos, su seguridad, su tolerabilidad y su eficacia

terapéutica. La ingesta diaria de esta bebida durante 28 días fue segura y bien tolerada. Además de confirmar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* sobre su acción inmunomoduladora y antioxidante, ésta mostró tener efectos protectores sobre el perfil lipídico, sobre todo en aquellos varones con altos niveles basales de algunos parámetros indicadores de un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

Estos resultados establecen evidencias científicas robustas sobre la bioactividad y las propiedades de estos LPHs. El objetivo último de esta tesis doctoral es poder transferir estos conocimientos a las empresas interesadas en el diseño y producción de alimentos biofuncionales (bebidas, geles, snacks, etc.) enfocados en mejorar el bienestar y la calidad de vida de la población humana.



**Resumen gráfico de los resultados obtenidos en la tesis doctoral**



## ÍNDICE

---





<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 HIDRÓLISIS PROTEICA .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 ENZIMAS HIDROLÍTICAS .....	5
1.2.2 ALCALASA 2.4 L .....	5
<b>1.3 PROCESOS POSTHIDRÓLISIS .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 ALIMENTACIÓN Y SALUD .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 SISTEMA INMUNE .....</b>	<b>9</b>
1.5.1 CÉLULAS Th1 .....	9
1.5.2 CÉLULAS Th2 .....	10
1.5.3 CÉLULAS Th9 .....	11
1.5.4 CÉLULAS Th17 .....	11
1.5.5 INTERLEUQUINA-10 .....	12
<b>1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA .....	13
1.6.2 CATALASA .....	13
1.6.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA .....	14
1.6.4 GLUTATIÓN REDUCTASA.....	14
<b>1.7 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS .....</b>	<b>15</b>
1.7.1 HIDROLIZADOS PROTEICOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA .....	17
1.7.2 HIDROLIZADOS PROTEICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	18
1.7.3 HIDROLIZADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ ( <i>Lupinus</i> spp.) .....	18
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3.2 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
3.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27

<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 ENSAYOS <i>in vitro</i> .....</b>	<b>31</b>
4.1.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS .....	31
4.1.2 CULTIVOS CELULARES .....	32
4.1.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR .....	33
4.1.4 EXTRACCIÓN DE ARN .....	34
4.1.5 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (RETROTRANSCRIPCIÓN) .....	35
4.1.6 DISEÑO DE LOS CEBADORES .....	36
4.1.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (qPCR) .....	36
4.1.8 ELECTROFORESIS DE ADN .....	38
4.1.9 CUANTIFICACIÓN EXTRACELULAR DE CITOQUINAS .....	39
4.1.10 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	41
<b>4.2 ENSAYOS <i>in vivo</i> .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 PREPARACIÓN DE LA BEBIDA EXPERIMENTAL .....	45
4.2.2 DISEÑO Y SUJETOS DE ESTUDIO .....	46
4.2.3 ANÁLISIS DE LA SALUD DE LOS PARTICIPANTES .....	48
4.2.4 ANÁLISIS SOBRE LA ACEPTABILIDAD DE LA BEBIDA .....	50
4.2.5 MEDICIONES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	51
4.2.6 CULTIVO CELULARES .....	53
4.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	53
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
5.1 Los LPHs reducen la proliferación celular estimulada con PHA sin ser citotóxicos .....	57
5.2 Los LPHs disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias del perfil Th1 .....	58
5.3 Los LPHs desplazan el balance pro-/antiinflamatorio hacia un fenotipo más protector .....	60
5.4 Los LPHs aumentan la capacidad antioxidante de las PBMCs .....	61
5.5 La bebida experimental no modifica el peso corporal de los voluntarios a lo largo del ensayo. ....	65

5.6 La bebida experimental no altera los parámetros generales del estatus de salud física y mental .....	66
5.7 La bebida experimental se tolera bien y no presenta efectos adversos .....	69
5.8 La bebida experimental no modifica los biomarcadores de la función hepática y renal .....	70
5.9 La bebida experimental no desencadena una respuesta inmune .....	73
5.10 La bebida experimental reduce la respuesta proinflamatoria .....	76
5.11 La bebida experimental desplaza la respuesta Th hacia un perfil Th2 .....	77
5.12 La ingesta de la bebida experimental aumenta la TAC de las PBMCs.....	78
5.13 La bebida experimental disminuye el índice aterogénico (LDL-C/HDL-C)..	78
5.14 La bebida experimental disminuye los niveles de metabolitos lipídicos en los voluntarios varones con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares .....	81
6. DISCUSIÓN .....	83
7. CONCLUSIONES .....	103
8. BIBLIOGRAFÍA.....	107
9. ANEXOS.....	121





## **1. INTRODUCCIÓN**

---



## **1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES**

El papel principal de la dieta es proporcionar suficientes nutrientes a nuestro cuerpo para que todos los procesos metabólicos puedan tener lugar, desencadenando una sensación de satisfacción y bienestar. Los conocimientos actuales demuestran que la dieta puede además modular diversas funciones en el organismo pudiendo jugar un papel beneficioso o perjudicial en algunas enfermedades (1). En este sentido, se define nutrición como el uso de alimentos para promover un estado de bienestar y una mejor salud para ayudar a reducir el riesgo de enfermedades. Por estos motivos en los últimos años ha aumentado el interés por investigar los efectos fisiológicos y beneficiosos de los alimentos en la salud humana (1).

Cuando un alimento, además de mantener los efectos nutricionales habituales, demuestra poseer un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo se define como alimento funcional (1).

El primer paso a seguir para la investigación y desarrollo de un alimento funcional es la identificación de una interacción específica de uno o algunos componentes del alimento con una o más funciones del organismo. Esto se lleva a cabo mediante la hidrólisis de nuestro alimento que nos permite estudiar los distintos fragmentos generados. Éstos pueden ser estudiados en su globalidad o aislar una determinada fracción (en el caso de las proteínas, por ejemplo, fragmentos que estén por encima o por debajo de un determinado peso molecular) o incluso estudiar un solo tipo de fragmento,

es decir, una mezcla de fragmentos que tienen una determinada secuencia de aminoácidos.

Los resultados nos llevarán a proponer un primer mecanismo hipotético de interacción, el cual deberá ser comprobado en estudios nutricionales estrictamente diseñados que involucren voluntarios. Además del estudio de eficacia, el desarrollo de un alimento funcional requiere de forma imprescindible la evaluación de su seguridad (1).

### **1.2 HIDRÓLISIS PROTEICA**

Las proteínas pueden ser degradadas a péptidos de diferentes tamaños y a aminoácidos libres, como resultado de la ruptura de los enlaces peptídicos. Esta degradación, denominada hidrólisis, puede llevarse a cabo a través de la digestión gastrointestinal (hidrólisis fisiológica), a través de ácidos o álcali (hidrólisis química) o a través de enzimas (hidrólisis biológica) (2). La hidrólisis fisiológica es el proceso normal de digestión de los alimentos que se desarrolla a lo largo del tracto gastrointestinal gracias a la presencia de enzimas alimentarias. La hidrólisis química apenas se utiliza ya que suele ser un proceso difícil de controlar, lleva a la formación de productos con cualidades nutricionales reducidas y, además, puede dar lugar a la formación de compuestos tóxicos (3). La hidrólisis enzimática se desarrolla en condiciones más suaves de pH (entre 7 y 10) y de temperatura (entre 40 y 60 °C). Estas condiciones reducen la formación de compuestos indeseables y mantienen el valor nutricional de la proteína de origen, ya que no se produce



degradación de los componentes hidrolizados. El resultado de esta hidrólisis muestra ventajas tecnológicas como la mejora en la solubilidad de los productos y en la estabilidad al calor (3).

### **1.2.1 ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

La capacidad de las enzimas para hidrolizar una proteína es muy variable. Por este motivo, es de fundamental importancia la elección de una enzima adecuada para poder obtener compuestos que tengan unas determinadas características físico-químicas y nutricionales (2).

Las enzimas hidrolíticas se distinguen según sus mecanismos de hidrólisis, dependiendo si se trata de una hidrólisis endopeptídica o exopeptídica (2). Las endopeptidasas son enzimas que hidrolizan las proteínas rompiendo al azar los enlaces peptídicos que se encuentran dentro de la proteína, produciendo de esta forma péptidos medianamente largos. Las exopeptidasas son enzimas que sistemáticamente eliminan aminoácidos de la porción N o C terminal.

### **1.2.2 ALCALASA 2.4 L**

La Alcalasa 2.4 L (EC 3.4.21.62) es una serina endopeptidasa con actividad específica de 2.4 unidades Anson (AU) por gramo. Pertenecce a la clase de enzimas microbianas subtilisina y procede de *Bacillus licheniformis*, una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo (4). Es una enzima ampliamente utilizada debido a que su actividad hidrolítica se desarrolla a un

pH suave (entre 7 y 10) y a una temperatura entre 50 y 60 °C, impidiendo, de esta forma, el crecimiento bacteriano durante el proceso de hidrólisis (4). Esta enzima, además, tiene un amplio espectro de especificidad (es capaz de romper enlaces peptídicos entre varias combinaciones de aminoácidos) y es totalmente soluble en agua (5). La Alcalasa 2.4 L se ha utilizado con éxito para mejorar las propiedades bioactivas de proteínas animales (6) y vegetales (7).

### **1.3 PROCESOS POSTHIDRÓLISIS**

De forma general, la hidrólisis enzimática por sí sola no es capaz de proporcionar un producto adecuado para su comercialización sin ser previamente procesado. Los procesos más comúnmente utilizados están focalizados en el control del tamaño molecular y en la eliminación/reducción del sabor amargo, consecuencia de la hidrólisis.

El control del peso molecular de los hidrolizados constituye un paso esencial para el desarrollo de hidrolizados proteicos para uso alimentario. En este contexto, la ultrafiltración se considera el procedimiento posthidrólisis más eficiente para la eliminación de péptidos y proteínas de altos pesos moleculares (2), ya que estos pueden comportarse como antígenos y producir una respuesta alérgica. De hecho, el uso de membranas con puntos de corte específicos reduce el contenido de posibles antígenos. Así, la ultrafiltración se considera el mejor método posthidrólisis capaz de reducir el contenido de antígenos en formulas hipoalergénicas (8).

Debido a las cualidades nutricionales y al coste, muchas fuentes vegetales han sido investigadas para la incorporación de hidrolizados proteicos en alimentos con el fin de conferirles una función beneficiosa para la salud humana. Aun así, solo en los últimos años ha aumentado de forma considerable el empleo de hidrolizados proteicos de origen vegetal para el desarrollo de alimentos capaces de tratar algunas enfermedades. La soja es una de las mayores fuentes vegetales estudiadas en el desarrollo de formulaciones especiales debido a sus propiedades beneficiosas sobre el organismo (9).

Una de las ventajas de los concentrados de proteínas vegetales y de sus aislados proteicos es que tienen excelentes propiedades para las enzimas proteolíticas. El alto contenido en proteínas y bajos niveles de azúcares e inhibidores de proteasas facilitan el control del proceso de hidrólisis, aumentando la eficacia de las enzimas proteolíticas y el rendimiento del proceso. Por el contrario, el principal inconveniente de los hidrolizados proteicos vegetales, además de tener un olor y un gusto desagradable, es el bajo nivel de algunos aminoácidos esenciales. Éstos tienen que ser añadidos en la formulación final para poder cumplir con los estándares mínimos del perfil de aminoácidos (2).

### 1.4 ALIMENTACIÓN Y SALUD

En los últimos años, muchos trabajos han resaltado que péptidos y proteínas procedentes de los alimentos pueden tener una actividad biológica beneficiosa sobre la salud humana (10, 11). Debido a la creciente popularidad de estos alimentos entre los consumidores, que continuamente demandan productos más saludables, capaces de mejorar su calidad de vida y así prevenir o tratar enfermedades, el estudio de los péptidos y proteínas procedentes de fuentes naturales es un campo emergente en el área de la tecnología de los alimentos y la salud. Una de las principales causas de muerte de la sociedad moderna son las enfermedades crónicas. Tanto la inflamación como el estrés oxidativo juegan un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de estas enfermedades (12).

La inflamación crónica da como resultado la generación de radicales libres que activan el proceso de daño y deterioro en las células y en los órganos. A su vez, los radicales libres inducen la activación de moléculas de señalización y factores de transcripción asociados con varias enfermedades crónicas (13). Muchas de éstas se pueden deber a un mal hábito alimenticio, a la poca actividad física y al consumo de alcohol y tabaco; de forma que una modificación en la dieta podría prevenirlas o retrasarlas. En este sentido, se ha demostrado que una baja ingesta de fruta y verduras es un factor de riesgo para enfermedades como el cáncer de estómago o páncreas (14).

El consumo de cereales integrales y leguminosas constituye la base de una dieta saludable ya que éstos reducen el riesgo de desarrollar varias

enfermedades crónicas. Los principales cereales o alimentos integrales son el trigo, el arroz y el maíz; mientras que las leguminosas más comúnmente consumidas son la soja, las lentejas y los guisantes. Estos cereales y legumbres contienen moléculas antioxidantes y antiinflamatorias (15).

## **1.5 SISTEMA INMUNE**

La inflamación es una respuesta inmune fisiológica mediada por diversos factores. Una respuesta excesiva puede contribuir al desarrollo de enfermedades agudas y crónicas. Células inmunes como los linfocitos y los macrófagos ( $M\phi$ ) juegan un papel preponderante en la respuesta inmune. Estas células secretan una variedad de proteínas que están implicadas en el mantenimiento del estado basal del organismo orquestando de manera sutil la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria. Entre estas proteínas destacan las citoquinas, cuya producción refleja el estado inmunológico y caracteriza las diferentes subpoblaciones de las células inmunes.

### **1.5.1 CÉLULAS Th1**

Las células T helper (Th) de tipo 1 (Th1) producen citoquinas inflamatorias como la interleuquina (IL) -2, la IL-12, el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Todas ellas juegan un papel importante en la activación de las células T y su proliferación. Las células Th1, además, activan a los  $M\phi$  y el proceso de fagocitosis (16).

El IFN- $\gamma$  es una citoquina específica del perfil Th1. Se produce en la defensa temprana del huésped contra una infección y activa las funciones efectoras microbicidas de los M $\phi$ . Así, los M $\phi$  activados por el IFN- $\gamma$  muestran un aumento de la pinocitosis, de la capacidad fagocítica mediada por receptores y una mayor capacidad de eliminar microbios. Además, se ha observado que el IFN- $\gamma$  está implicado en patologías autoinmunes como el lupus eritematoso, la esclerosis múltiple y la diabetes mellitus insulina-dependiente (17). El IFN- $\gamma$ , así como la IL-12, participan en la diferenciación de las células Th hacia un perfil Th1 (16).

Otra importante citoquina del perfil Th1, implicada en promover la inflamación, es el TNF. Éste se produce principalmente en el sitio de inflamación por parte de las células mononucleares infiltrantes participando, de esta forma, en la modulación de la respuesta inmune (18). Además, el TNF también está implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades autoinmunes y su producción excesiva durante la infección puede conducir a una toxicidad sistémica grave e incluso a la muerte (19).

### **1.5.2 CÉLULAS Th2**

Otro importante subtipo de células Th son las Th2, implicadas en la respuesta mediada por anticuerpos. Las células Th2 producen citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-13, implicadas en la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias. Estudios en ratones han demostrado la potente actividad antitumoral de ambas citoquinas y estudios

*in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad que tienen para inhibir la proliferación de algunas líneas celulares de cáncer humano (20). Esta subpoblación está implicada en la inducción de la respuesta inmune mediada por anticuerpos y en la inhibición de la diferenciación hacia un perfil Th1 y de la respuesta fagocítica (16).

### **1.5.3 CÉLULAS Th9**

Las células Th9 se han definido recientemente. Las funciones más comúnmente asociadas a esta subpoblación celular son el control de los genes que están implicados en la supervivencia celular, en la proliferación y en la secreción de mediadores inflamatorios (21). Además, la IL-9 se ha relacionado con procesos autoinmunes y con el desarrollo de enfermedades alérgicas (22).

### **1.5.4 CÉLULAS Th17**

El subtipo Th17 expresa IL-17, que es una importante citoquina proinflamatoria implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes y alergias a los alimentos (23, 24). Las células Th17 son células efectoras importantes en la defensa del huésped contra ciertos patógenos y bacterias específicas, además, inducen inflamación tisular y han sido asociadas con diversas condiciones inflamatorias humanas (25).

### **1.5.5 INTERLEUQUINA-10**

La IL-10 se considera la clásica citoquina antiinflamatoria y se produce principalmente por las células T reguladoras y Th2, las cuales juegan un papel clave en el control de los procesos inflamatorios (26). La IL-10 está implicada en bloquear la síntesis de citoquinas y en suprimir la respuesta inflamatoria, limitando así el potencial daño causado por la inflamación (26). La IL-10 también previene la proliferación de las células T antígeno-específica mediante la inhibición de la capacidad de los monocitos para presentar el antígeno (27). Numerosos trabajos han mostrado el efecto protector de la IL-10 en patologías autoinmunes como la esclerosis múltiple (28) y la artritis reumatoide (29).

### **1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES**

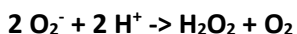
Además de las citoquinas, el sistema inmune utiliza las especies reactiva del oxígeno (ROS) para eliminar a los patógenos. A nivel fisiológico, las ROS son esenciales para la supervivencia celular; aun así, un considerable aumento en la producción de estas especies podría generar daño celular y, finalmente, su muerte (30).

Para prevenir daños celulares irreversibles se activan los sistemas antioxidantes, implicados en restablecer y mantener la homeostasis red-ox. Hay varios enzimas implicados en el mantenimiento del balance red-ox intracelular, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) (31).



### 1.6.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA

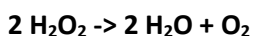
La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), descrita por primera vez en 1969, es una enzima que reacciona con el radical superóxido ( $O_2^-$ ) para convertirlo en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno ( $O_2$ ), según la siguiente reacción:



Esta enzima está presente en casi todos los organismos aeróbicos y en los compartimentos subcelulares donde se produce mayor estrés oxidativo (32). El  $H_2O_2$  que se genera de esta reacción debe ser rápidamente transformado en agua ( $H_2O$ ) debido a su alta toxicidad (30). Para esto pueden intervenir dos enzimas capaces de transformar el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , la CAT o la GPx (32).

### 1.6.2 CATALASA

La catalasa (EC 1.11.1.6), descrita por primera vez en 1901, transforma el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  a una gran velocidad según la siguiente reacción:



Esta enzima es ubicua, aunque su presencia es más abundante en el hígado, en los riñones y en los eritrocitos (33).

### 1.6.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA

La glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), descrita por primera vez en 1957, cataliza la reacción de transformación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  por medio de la transformación del glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG) según la siguiente reacción:



Esta enzima se localiza preferentemente en el hígado y en menor concentración en los eritrocitos, corazón, pulmones y riñones. Su actividad se localiza, en un 70%, en el citoplasma y en un 30%, en la matriz mitocondrial (34).

### 1.6.4 GLUTATIÓN REDUCTASA

La glutatión reductasa (EC 1.8.1.7), purificada por primera vez en 1955, permite la regeneración del GSH mediante una reacción que cataliza la reducción del GSSG a GSH, utilizando como cofactor el NADPH según la siguiente reacción:



Esta reacción es esencial para el mantenimiento de los niveles de glutatión en forma reducida (GSH). La GR está presente de forma ubicua y no solo se encuentra en el citoplasma sino también en la matriz mitocondrial (35).

Las ROS, además de participar en los normales procesos biológicos de la célula, también juegan un papel muy importante a la hora de regular la

respuesta inmune (30). A este respecto, el sistema inmune utiliza el  $O_2^-$  para eliminar los microorganismos invasores. Debido a su alta toxicidad, este es rápidamente transformado en  $O_2$  y  $H_2O_2$ , gracias a la SOD (32). El  $H_2O_2$  que se genera es, a su vez, peligroso para las células ya que es el precursor del radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), un compuesto altamente tóxico producido a través de la reacción de Fenton (36). Por este motivo existen dos enzimas capaces de eliminar rápidamente el  $H_2O_2$ : la CAT y la GPx. Por un lado, la CAT puede convertir millones de moléculas de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  cada segundo (33); mientras que por el otro, la GPx reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  utilizando el GSH (34). El GSH juega un importante papel en los sistemas de defensa antioxidante y en muchos procesos metabólicos, como la desintoxicación de los xenobióticos y algunos compuestos endógenos (37). Por este motivo, el mantenimiento de los niveles de GSH es extremadamente importante en los procesos biológicos. Estos niveles son mantenidos gracias a la enzima GR, la cual es capaz de catalizar la transformación del GSSG a GSH (35).

## **1.7 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS**

El uso de péptidos bioactivos, procedentes de los alimentos, es un nuevo hallazgo en el campo de la nutrición. El objetivo último del uso de estos péptidos es modular las funciones biológicas y tratar, prevenir o reducir el riesgo de enfermedad.

Estos péptidos están integrados en la secuencia original de la proteína, de forma que solo tras su liberación pueden ejercer su función biológica (38).

En este sentido, se han descrito péptidos con función inmunomoduladora (11), antimicrobiana (39) y antioxidante (40) en sistemas *in vitro*. Varios estudios han mostrado que péptidos procedentes de fuentes animales, en especial de proteínas de la leche y del huevo, pueden influenciar la respuesta inmunológica y el balance oxidativo (41, 42). También se han demostrado los efectos *in vitro* de hidrolizados proteicos de origen vegetal sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo (43). Así, hidrolizados de proteínas de arroz, generados con la endopeptidasa tripsina, mejoran la función inmune promoviendo la fagocitosis en leucocitos humanos (44) e hidrolizados proteicos del guisante (*Vigna subterranea*) protegen frente a varios radicales libres (45).

La soja (*Glycine max*) es una de las fuentes proteicas vegetales más estudiadas debido a su bajo coste, a su buen valor nutricional, a sus propiedades funcionales y a su manejabilidad a la hora de producir diferentes productos (leche, aceite, queso, tofu, etc.) (46). Varios grupos han descrito que diversos péptidos de la soja obtenidos con diferentes sistemas de hidrólisis tienen propiedades antimicrobianas (47), antidiabéticas (48), antioxidantes (49) y oncostáticas (50). Además, estos péptidos pueden inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) (51), implicada en la regulación de la presión sanguínea, y también pueden actuar sobre el metabolismo del colesterol (52).

### **1.7.1 HIDROLIZADOS PROTEICOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

La nutrición y la inmunidad están fuertemente asociadas, ya que se ha demostrado que hidrolizados proteicos de distintas fuentes alimentarias ejercen efectos inmunomoduladores, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Hidrolizados proteicos de soja tienen un efecto antiinflamatorio, gracias a su capacidad para inhibir marcadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) y el TNF (11). Otros estudios en modelos animales han descrito que hidrolizados proteicos de la soja podrían estar implicados en la supresión de la oncogénesis a nivel del colon y del hígado (53, 54). De igual forma, hidrolizados de proteínas de la leche han sido ampliamente estudiados, demostrándose que tienen capacidad inmunomoduladora (41). En un estudio en ratones se ha descrito su capacidad para estimular la producción de anticuerpos (55).

Los hidrolizados proteicos de huevo también presentan actividad inmunomoduladora, ya que aumentan la actividad fagocítica de los Mφ e inducen la secreción de IL-4, IL-13, IL-10, IL-6 e IFN-γ (56). Hidrolizados proteicos de arroz también incrementan la actividad fagocítica, además de aumentar la producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en células de sangre periférica humana (44).

De esta forma, es razonable pensar que la incorporación de los hidrolizados proteicos en los alimentos podría conferirles propiedades beneficiosas para la salud humana.

### **1.7.2 HIDROLIZADOS PROTEICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Las actividades antioxidantes de los hidrolizados proteicos procedentes de fuentes vegetales como la soja (57), el cáñamo (58) y el garbanzo (59) se han investigado ampliamente usando sistemas de evaluación *in vitro*.

Varios estudios han mostrado que los hidrolizados proteicos pueden tener un efecto antioxidante. Por este motivo, su introducción en los alimentos puede reducir su oxidación intrínseca durante el almacenamiento. Ejemplos de ello son los hidrolizados de gluten de maíz (60), de garbanzo (59) y de colza (61). De esta forma podríamos utilizar antioxidantes procedentes de fuente naturales y obviar el uso de antioxidantes sintéticos, para los cuales se han descrito ciertos efectos tóxicos sobre el organismo humano (62).

Además, estos péptidos podrían ser utilizados como antioxidantes naturales para proteger el cuerpo humano contra el daño oxidativo y las enfermedades asociadas.

### **1.7.3 HIDROLIZADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ (*Lupinus spp.*)**

El altramuz pertenece a la familia Fabaceae, comúnmente conocidas como leguminosas, que es una de las familias de alimentos más importantes en la nutrición humana en todo el mundo (soja, garbanzos, guisantes, lentejas, etc.). La producción mundial de semillas de altramuz en 2016 fue cercana a 1.3 millones de toneladas (MT); aun así, muy por debajo de la producción de

otras leguminosas como la soja (335.0 MT) o los garbanzos (12.1 MT) (FAOSTAT, 2018).

El altramuz se introdujo en el norte de Europa como un medio para mejorar la calidad del suelo. Tiene una alta composición de proteínas, fibra dietética y antioxidantes, y son muy pobres en almidón, como todas las legumbres, además de no tener gluten y posee la ventaja adicional de ser un alimento libre de modificaciones genéticas.

Aunque la introducción del altramuz en el consumo humano es todavía limitada, la presencia de variedades de "altramuz dulce" con bajo contenido en alcaloides permite estudiar la obtención de compuestos de alto valor nutricional con un gran potencial beneficioso en la nutrición humana, como los péptidos bioactivos que se encuentran en esta materia prima. Así, se ha mostrado que hidrolizados proteicos de altramuz, digeridos con la endopeptidasa pepsina, tienen un efecto inhibitorio sobre la ACE (63). Además, se ha descrito que tanto las proteínas totales como los hidrolizados proteicos de diferentes especies del género *Lupinus* spp., obtenidos mediante la digestión con pepsina o tripsina, poseen actividad hipocolesterolémica *in vitro* (64).

Recientemente nuestros colaboradores del grupo de Proteínas Vegetales del Instituto de la Grasa (Consejo Superior de Investigación Científica-CSIC, Sevilla) han descrito que los hidrolizados proteicos de *Lupinus angustifolius* (LPHs), obtenidos mediante el uso de la endopeptidasa Alcalasa 2.4 L, pueden ejercer efectos antiinflamatorios en sistemas *in vitro*

libres de células y en Mφ cultivados derivados de línea celular monocítica humana THP-1 (Mφ-THP-1) (65, 66), siendo estos hallazgos el punto de partida de la presente tesis doctoral.





## 2. HIPÓTESIS

---



Debido a los efectos sobre el sistema inmune y parámetros oxidativos que han demostrado los hidrolizados proteicos de *Lupinus angustifolius* (LPHs) en ensayos previos realizados tanto en sistemas *in vitro* libres de células como en macrófagos derivados de la línea celular monocítica humana THP-1, la hipótesis de partida de la presente tesis doctoral plantea que la administración *in vitro* de LPHs a cultivos de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMCs) modulará su respuesta inmune y el estado red-ox. Asimismo, la ingestión de una bebida experimental conteniendo los LPHs mejorará el estatus inmunológico, a la vez que disminuye el estado de oxidación de los sujetos de estudio.





### **3. OBJETIVOS**

---



### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si la administración *in vitro* de los LPHs ejerce un efecto inmunomodulador y antioxidante sobre PBMCs de voluntarios sanos.

#### **3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.1.1.1 Evaluar el efecto de los LPHs sobre la proliferación celular y la citotoxicidad.

3.1.1.2 Cuantificar el papel de los LPHs sobre la producción de citoquinas pro-/antiinflamatorias.

3.1.1.3 Analizar la capacidad antioxidante de los LPHs.

### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia terapéutica de la ingesta de una bebida experimental, formulada a base de los LPHs evaluados *in vitro*, en un ensayo alimentario en voluntarios sanos.

#### **3.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1.1 Valorar la seguridad y la tolerabilidad de la ingestión del preparado mediante la vigilancia de los pacientes a lo largo del

estudio, la cuantificación de marcadores antropométricos y de marcadores bioquímicos hepáticos, renales e inmunológicos.

3.2.1.2 Análisis del estado de salud general mediante el cuestionario SF-36.

3.2.1.3 Analizar la acción de la bebida sobre la actividad inmunomoduladora y antioxidante de los voluntarios.

3.2.1.4 Evaluar el efecto de la ingesta de la bebida sobre el metabolismo de macromoléculas.





## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



#### **4.1 ENSAYOS *in vitro***

##### **4.1.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS**

Los LPHs se generaron en el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), por parte del grupo de Proteínas Vegetales del Departamento de Alimentación y Salud, como se describió previamente (66). Los aislados proteicos de altramuz (con una riqueza proteica del 82.55%) se disolvieron en agua destilada (10% p/v) a un pH de 8 y 50°C de temperatura. Tras 30 minutos, se añadió la enzima Alcalasa 2.4 L durante 30 minutos (relación enzima/sustrato = 0.1 UA/g proteína), siempre ajustando el pH a 8 mediante la adición de NaOH en concentraciones apropiadas. La inactivación de la enzima se llevó a cabo bajando el pH a 4, utilizando HCl 6N. La centrifugación a 8 000 rpm durante 15 minutos permitió recuperar el hidrolizado proteico (sobrenadante), el cual se pasó a un nuevo tubo, y eliminar el aislado proteico no hidrolizado (pellet). El sobrenadante se congeló durante toda la noche para, posteriormente, liofilizarse, ultrafiltrarse (con corte de peso molecular de 10 kDa) y mantenerse a 4°C hasta su empleo. Antes de cada experimento, el liofilizado se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (BioWest, Nuaillé, Francia) a una concentración final de 4 mg/mL. Una vez que el liofilizado se disolvió completamente, se filtró a través de una membrana estéril con poros de 0.2 µm de tamaño y se autoclavó.

#### 4.1.2 CULTIVOS CELULARES

Las PBMCs se obtuvieron de las capas leucocitarias de muestras de sangre (buffy coat) procedentes de 53 donantes adultos sanos anónimos procedentes del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA) en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) (Sevilla). Este estudio siguió las directivas de la Declaración de Helsinki para la investigación médica con sujetos humanos y fue aprobado por el Comité Ético del HUVR (referencia número: 2012PI/200) (Anexo 1). Todos los donantes firmaron el consentimiento informado.

Las PBMCs se aislaron mediante centrifugación de los tubos Vacutainer CPT™ a 1 650 g durante 20 minutos. A través de la centrifugación, las PBMCs, por su menor densidad, se trasladaron al líquido de gradiente de densidad (Ficoll) y se colocaron por encima del gel presente en el tubo CPT™. El gel formó una barrera estable e impermeable a los eritrocitos y neutrófilos, los cuales se depositaron en el fondo del tubo. Tras la centrifugación, se pasó el sobrenadante (la parte que estaba encima del gel) a un tubo cónico de 50 mL, que se llevó a un volumen de 50 mL con buffer fosfato salino (PBS) y se centrifugó a 600 g durante 5 minutos, para obtener el pellet de células. Éste se lavó dos veces con PBS y por último se contaron las células obtenidas. Para el conteo celular se usó la cámara de Neubauer utilizando 10 µL de una dilución 1:20 con la suspensión celular en RPMI incompleto y azul tripán. Las células se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 completado con 10% de suero fetal bovino (previamente inactivado por calor),

2mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 U/mL estreptomicina (todos de BioWest) en presencia o ausencia del mitógeno fitohemaglutinina-P (PHA; a una concentración de 8 µg/mL; Sigma-Aldrich) y las concentraciones indicadas de LPHs. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% a diferentes tiempos en función del experimento.

#### **4.1.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR**

La proliferación y viabilidad celular se determinaron en cultivos celulares de 72 horas estimulados con PHA (para la proliferación celular) o sin estimular (para la viabilidad celular). Los cultivos celulares se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 µL (100 000 células/pocillo). La proliferación celular se midió mediante el kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (Roche). Este kit se basa en la incorporación del nucleótido sintético análogo a la timina, la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), durante la fase de replicación celular estimulada por el PHA. La BrdU se añadió a las células durante las últimas 14 horas de cultivo. De esta forma, aquellas células que proliferaban incorporaban BrdU en sus nuevas cadenas de ADN. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, las células se fijaron y se desnaturalizaron parcialmente por calor para mejorar la exposición del epítipo de la BrdU. Posteriormente, la muestra se incubó con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Tras esto, se añadió el sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina), de color amarillo, que se transforma por la peroxidasa dando una coloración azul oscuro. La reacción

fue parada añadiendo una solución 1:6 de HCl:agua (v/v), que transforma el color azul en amarillo, cuya absorbancia fue medida a una longitud de onda de 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620 nm), mediante el espectrofotómetro de microplaca Multiskan™ FC (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia). El valor de absorbancia de fondo obtenido con un control blanco fue restado de todas las muestras.

La viabilidad celular se ensayó añadiendo el reactivo WST-1 (Roche Diagnostic, Basel, Suiza) durante las últimas 5 horas de cultivo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este test se basa en la escisión de la sal de tetrazolio (WST-1) en formazano soluble mediante un mecanismo celular que se produce principalmente en la superficie de la célula. Esta reducción depende en gran medida de la producción de NAD(P)H en células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazano, es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo celular. El formazano emite un color cuya absorbancia se cuantificó a una longitud de onda de 450 nm.

### **4.1.4 EXTRACCIÓN DE ARN**

Para la obtención de ARN total las células se cultivaron durante 16 horas con o sin LPHs en placas de 6 pocillos en un volumen final de 6 mL ( $6 \times 10^6$  células/pocillo). La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se añadieron 750  $\mu$ L de Tripure Isolation Reagent a cada pocillo para romper las células. El homogenado celular fue recogido en tubos

ependorf de 1.5 mL a los cuales se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo y posteriormente fueron centrifugados a 12 000 g durante 15 minutos a 4°C para obtener la separación de las fases (proteínas-ADN-ARN). La fase acuosa con el ARN se pasó a un nuevo tubo al cual se le añadió 500  $\mu$ L de isopropanol y se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos a 4°C para llevar a cabo la precipitación del ARN. Una vez obtenido el pellet de ARN, éste se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 75%. Por último, el pellet, una vez secado, se resuspendió en agua libre de RNasa. La cantidad y la pureza del ARN se analizaron con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Valores de absorbancia entre 1.8-2.00 de los ratios  $\lambda=260/280$  y  $\lambda=260/230$  se consideraron aceptables.

#### **4.1.5 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (RETROTRANSCRIPCIÓN)**

El ADN complementario (cDNA) monocatenario se sintetizó a partir de 3  $\mu$ g de ARN inicial en una reacción llevada a cabo con el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se desarrolló utilizando el termociclador Biometra Tgradient (Biometra GmbH, Göttingen, Alemania) en un volumen final de 20  $\mu$ L siguiendo las siguientes condiciones: 40 minutos a 55°C para la fase de síntesis del cDNA, 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima y 5 minutos a 4°C. Tras la retrotranscripción, las muestras se diluyeron en agua libre de RNasa para

obtener una concentración final de 10 ng/ $\mu$ L. El cDNA se conservó a -20°C hasta su uso.

### **4.1.6 DISEÑO DE LOS CEBADORES**

Los cebadores utilizados a lo largo del estudio se diseñaron mediante el programa Oligo Primer Analysis Software, versión 6 (Molecular Biology Insights Inc, Colorado Springs, CO, USA). Una vez definidas las secuencias, se comprobó si estas eran específicas al gen de interés a través de la herramienta gratuita on-line Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Institutos Nacionales de Salud, NIH; Maryland, USA).

### **4.1.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (qPCR)**

Las qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos mediante el uso del termociclador LightCycler® 480 II (Roche). Cada reacción se realizó por duplicado utilizando el reactivo LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche), en un volumen final de 20  $\mu$ L conteniendo 40 ng/pocillo de cDNA y 200 nM de cada cebador. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 minutos de pre-incubación a 95°C; 45 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, alineamiento (según cebador) a la temperatura indicada en la Tabla 1 durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 10 segundos; al final de los ciclos se generó una curva de melting



para comprobar la especificidad del producto. La secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de alineamiento, de melting y el tamaño del amplicón generado se describen en la Tabla 1. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con los niveles de expresión del gen de referencia  $\beta$ -actina y la expresión génica relativa fue calculada respecto a la situación control mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

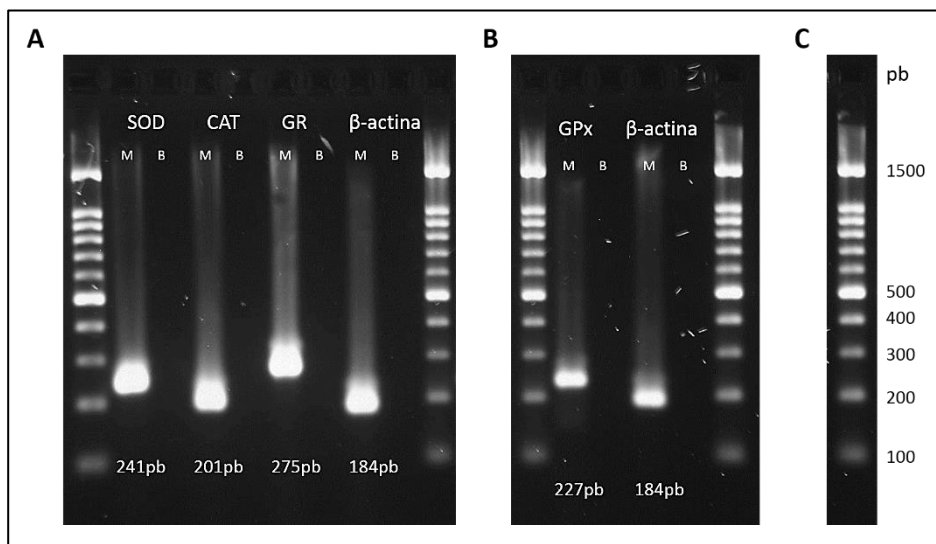
**Tabla 1. Características de los cebadores utilizados para la qPCR.**

Gen	Secuencias de los cebadores	Ta (°C)	Tm (°C)	Producto (bp)
<b><i>β-ACTINA</i></b>	Fwd 5'-AGA GCT ACG AGC TGC CTGAC-3' Rev 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TACAG-3'	56; 60	87.3	184
<b><i>CAT</i></b>	Fwd 5'-TAA GAC TGA CCA GGG CAT C-3' Rev 5'-CAA ACC TTG GTG AGA TCG AA-3'	56	82.9	201
<b><i>SOD</i></b>	Fwd 5'-AGG TGT GGG GAA GCA TTA-3' Rev 5'-TGG TCT CCT GAG AGT GAG ATC-3'	56	84	241
<b><i>GPx</i></b>	Fwd 5'-AGT CGG TGT ATG CCT TCT CGG-3' Rev 5'-GTT CTT GGC GTT CTC CTG ATG-3'	60	91.6	227
<b><i>GR</i></b>	Fwd 5'-GCC CTG GGT TCT AAG ACA TCA-3' Rev 5'-CTC AGG TCC TTG GTA TTC GGG-3'	56	86.4	275

Secuencias de los distintos genes utilizadas para la realización de las qPCR, la temperatura de alineamiento (Ta) utilizada en la segunda etapa de la qPCR, la temperatura de melting (Tm) específica de cada gen y el tamaño del producto de PCR, en pares de bases.  $\beta$ -ACTINA, gen de referencia; CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa.

#### 4.1.8 ELECTROFORESIS DE ADN

El tamaño del producto de PCR se comprobó mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Fig. 1). En cada pocillo del gel se cargaron 10  $\mu$ L de muestra (producto de PCR) mezclados con 2.5  $\mu$ L de bromuro de Etidio (1mg/mL) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) y 2.5  $\mu$ L de tampón de carga 6X (0.004 M azul de bromofenol, 33 mL v/v glicerol en agua milli Q). Se aplicó un voltaje de 80 V, a amperaje constante, durante 40 minutos. Las bandas resultantes se compararon con un marcador con el fin de determinar la longitud del amplicón y se visualizaron y fotografiaron mediante el transiluminador UVP BioDoc-It® Imaging Systems (Analytik Jena, Jena, Alemania).



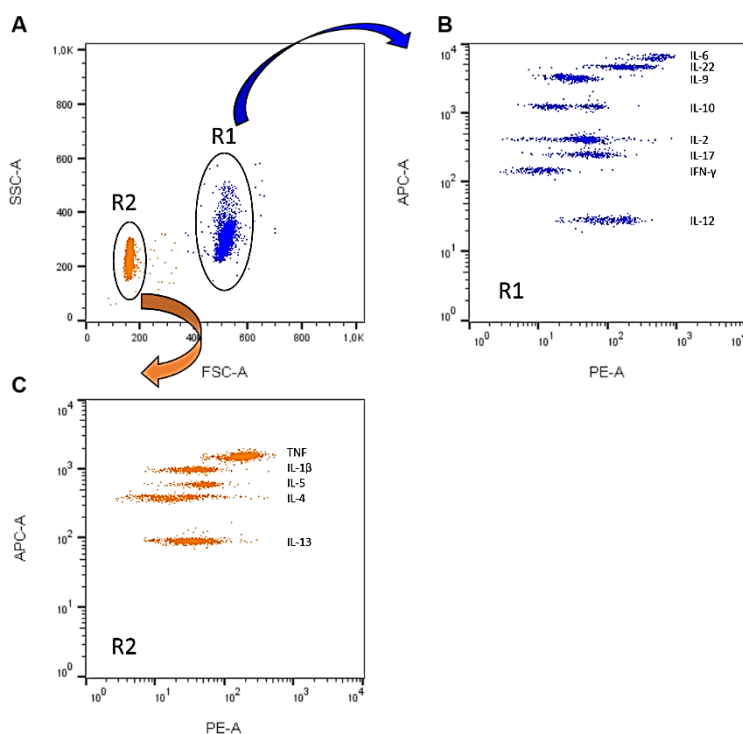
**Figura 1. Foto representativa del gel de agarosa para comprobar la longitud de los productos de PCR.** Electroforesis de los genes utilizados en el estudio, con una temperatura de alineamiento de 56°C (A) y de 60°C (B). La escala utilizada para comparar el tamaño de las distintas bandas tenía fragmentos de ADN entre 1 500 y

100 par de bases (C). pb, pares de bases;  $\beta$ -ACTINA, gen de referencia; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; M, muestra; B, control negativo.

#### **4.1.9 CUANTIFICACIÓN EXTRACELULAR DE CITOQUINAS**

Los niveles de citoquinas representativas de las respuestas Th1, Th2, Th9 y Th17 se determinaron en el sobrenadante de cultivos celulares de 48 horas, en PBMCs estimuladas con PHA y tratadas con las concentraciones indicadas de LPHs, utilizando el kit Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos celulares se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100  $\mu$ L (100 000 células/pocillo). 25  $\mu$ L de sobrenadante se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con una combinación de microesferas recubiertas con anticuerpos capaces de reconocer a cada una de las citoquinas estudiadas, y con una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con biotina que se unirán a los analitos capturados por el anticuerpo primario (el conjugado con la microesfera). Cada microesfera se puede diferenciar mediante su tamaño y su diferente espectro de emisión en el canal de la alofocianina (APC). Tras las 2 horas de incubación, se añadió una solución de estreptavidina-ficoeritrina (PE). La estreptavidina se unió a la biotina presente en los anticuerpos secundarios y la fluorescencia emitida por la PE se detectó mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Los datos fueron analizados mediante el programa FlowCytomix Pro. A través de un dot-plot entre forward (FSC) y side

scatter (SSC) fue posible identificar dos poblaciones (los dos grupos de microesferas, R1 y R2) (Fig.2 A). Dentro de cada población se pudieron distinguir las distintas citoquinas mediante un segundo dot-plot entre la emisión de la PE y de la APC (emisión lejana del rojo) (Fig.2 B, C). Cuanto mayor era la emisión de la PE, mayor era la producción de esa citoquina.



**Figura 2. Dot-plot de citometría para la identificación y cuantificación de citoquinas mediante el kit FlowCytomix (eBioscience).** Dot-plot entre SSC y FSC, identificando las poblaciones R1 y R2 (A). Dot-plot entre PE y APC, identificando las citoquinas pertenecientes a la población R1 (B) y las pertenecientes a la población R2 (C). APC, alofocianina; FSC, forward scatter; IFN-γ, interferón-γ; IL, interleuquina; PE, ficoeritrina; SSC, side scatter; TNF, factor de necrosis tumoral.

#### **4.1.10 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

Las actividades enzimáticas de las enzimas antioxidantes estudiadas se midieron en los sobrenadantes de los cultivos en las mismas condiciones que para la extracción de ARN, mediante kit específicos colorimétricos. El sobrenadante se repartió en diferentes alícuotas para cada ensayo y éstas se guardaron a -20°C hasta su utilización. Las distintas absorbancias se midieron en el lector de placas Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Suiza). Los resultados de las actividades enzimáticas se representaron en porcentaje, considerando como el 100% la condición sin hidrolizado.

#### **SUPERÓXIDO DISMUTASA**

Para medir la actividad de la SOD se empleó el kit DetectX® Superoxide Dismutase (SOD) Colorimetric Activity Kit (ArborAssays, MI, USA). 10 µL de sobrenadante se mezclaron con el sustrato de detección y con xantina oxidasa durante 20 minutos a temperatura ambiente. En presencia de oxígeno la xantina oxidasa generó superóxido el cual convirtió el sustrato de detección incoloro en un producto de color amarillo. La absorbancia de este producto se leyó a una longitud de onda de 450 nm. Niveles crecientes de SOD en la muestra provocaron una disminución de la concentración del superóxido y, de esta forma, una disminución del producto de color amarillo. Los resultados se calcularon en términos de unidades de actividad de SOD por mL (U/mL).

### CATALASA

Para medir la actividad de la CAT se utilizó el kit Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, MI, USA). 20  $\mu$ L de sobrenadante se mezclaron con Assay Buffer y metanol 100% para que se pudiera formar formaldehído en presencia de catalasa. Éste se midió colorimétricamente con la 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (purpald). El purpald formó un heterociclo bicíclico con los aldehídos pasando de una forma incolora a un color púrpura. La absorbancia de este producto se midió a una longitud de onda de 540 nm. Así, se calculó primero la concentración de formaldehído ( $\mu$ M) (medido de forma indirecta con el purpald) y luego la actividad de la CAT, definiéndose una unidad de actividad de CAT como la cantidad de enzima capaz de formar 1.0 nmol de formaldehído por minuto a temperatura ambiente.

### GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad GPx se cuantificó mediante el kit Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical). Se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra con una mezcla de NADPH, GSH y GR, y, posteriormente, se añadió hidroperóxido de cumeno para iniciar la reacción. De esta forma la GPx presente en la muestra, utilizando el GSH, redujo el hidroperóxido de cumeno formando así el GSSG. El GSSG a su vez se recicló a GSH gracias a la actividad de la GR, la cual utilizó NADPH, convirtiéndolo en  $\text{NADP}^+$ . La oxidación de NADPH a  $\text{NADP}^+$  se reflejó en un decremento de la absorbancia a una longitud de onda 340 nm. De esta forma se pudo calcular la actividad de la GPx, definiéndose una unidad de

actividad de GPx como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1.0 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por minuto a temperatura ambiente.

#### GLUTATIÓN REDUCTASA

La actividad de la GR se midió utilizando el kit Glutathione Reductase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, CA, USA). 100 µL de muestra se pretrataron con 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente para que se pudiera transformar todo el GSH en GSSG gracias a la intervención de la GPx que transforma el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Posteriormente se añadieron 5 µL de catalasa y la muestra se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar todo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobrante y así finalizar la actividad de la GPx. 50 µL de esta muestra pretratada se mezclaron con 50 µL de mezcla conteniendo Assay Buffer, DTNB, NADPH y GSSG. La GR presente en la muestra transformó el GSSG en GSH con la ayuda de NADPH. El GSH reaccionó con el ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) transformándolo en TNB<sup>2-</sup> que tiene una coloración amarilla y que absorbe a una longitud de onda de 405 nm. Se calculó la actividad de GR definiéndose una unidad de actividad de GR como la cantidad de enzima que es capaz de generar 1.0 µmol de TNB<sup>2-</sup> por minuto a temperatura ambiente. La oxidación de 1 mol de NADPH a NADP<sup>+</sup> generará 2 moles de TNB<sup>2-</sup>, por lo tanto, una unidad de TNB<sup>2-</sup> equivale a 0.5 unidades de NADPH.

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TAC)

Para medir la TAC se utilizó el kit OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Cell Biolabs, CA, USA). 20  $\mu\text{L}$  de muestra se mezclaron con 180  $\mu\text{L}$  de Assay Buffer. A esta mezcla se le añadieron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo conteniendo iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar los 5 minutos, la reacción se paró con 50  $\mu\text{L}$  de solución de stop y se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. En presencia de antioxidantes, el cobre en forma oxidada ( $\text{Cu}^{2+}$ ) se redujo a  $\text{Cu}^+$  y este se unió al cromógeno presente en la mezcla de reacción. El cromógeno absorbe luz a 490 nm. Gracias a la curva estándar se calculó la concentración “equivalente a los mM de ácido úrico” (UAE). Para determinar la concentración “equivalente a los  $\mu\text{M}$  de reductores del cobre” (CRE), se multiplicó el valor de UAE por 2 189  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ /mM ácido úrico, ya que 1 mM de ácido úrico es igual a 2 189  $\mu\text{M}$  de reductores del cobre. De esta forma los valores de CRE fueron proporcionales a la capacidad/poder antioxidante total de la muestra.



## **4.2 ENSAYOS *in vivo***

### **4.2.1 PREPARACIÓN DE LA BEBIDA EXPERIMENTAL**

La bebida experimental basada en los LPHs se formuló como una emulsión compuesta por un 95% (p/p) de una fase acuosa (FA) y un 5% de fase oleosa (FO). La FA estaba compuesta por los LPHs (0.53% p/p), goma xantana (0.125% p/p), azúcar (6% p/p) y aroma de vainilla (0.18% p/p) disueltos en agua potable (93.165% p/p). La FO estaba compuesta íntegramente por aceite de girasol refinado. La FO y la FA se prepararon por separado y luego se mezclaron. La FA se obtuvo mezclando partes iguales de la solución A y la solución B. La solución A era una solución acuosa con 1.17% (p/p) de LPHs, 14.03% (p/p) de azúcar, 0.42% (p/p) de aroma de vainilla y 84.38% (p/p) de agua. La solución B era una solución acuosa con 0.250% (p/p) de goma xantana. Ésta se preparó añadiendo poco a poco la goma xantana en agua caliente (80°C) con una agitación suave durante 1 hora. Una vez completamente disuelta la goma xantana, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se preservó durante 24 horas para una hidratación óptima. La emulsión final se obtuvo mediante dos pasos: una primera emulsión (preemulsión) se obtuvo añadiendo lentamente la FO a la FA y homogenizando con el equipo ULTRA-TURRAX® (Ika Lab., T25 basic, Alemania) a 8 000 rpm. Tras este primer paso, la preemulsión se pasó a través de un homogenizador de alta presión (Emulsiflex-2000-B3, Avestin, Ottawa, Canadá) a 70 000 psi ( $4,83 \times 10^8$  Pa) para obtener la bebida experimental final. La bebida fue realizada y empaquetada por PULEVA (Lactalis, Francia) en briks

de 200 mL estériles (conteniendo 5 mg/mL de LPHs), de acuerdo a la normativa europea sobre el procesamiento de los alimentos.

### **4.2.2 DISEÑO Y SUJETOS DE ESTUDIO**

Se realizó un ensayo alimentario de diseño abierto, controlado antes-después, en voluntarios sanos denominado “Lupine-1” (ClinicalTrials.gov; Identificador NCT02590887). Este estudio clínico de diseño longitudinal siguió las directivas de la Declaración de Helsinki para la investigación médica con sujetos humanos y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío (referencia número: 2015/110) (Anexo 2). Los participantes se reclutaron de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión descritos en la Tabla 2 y todos firmaron el consentimiento informado.

**Tabla 2. Criterios de inclusión y de exclusión para el reclutamiento de los voluntarios del ensayo “Lupine-1”.**

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
1. Edad entre los 18 y 60 años	1. Enfermedad preexistente
2. Peso corporal dentro de la normalidad (IMC entre 19 y 26 kg/m <sup>2</sup> )	2. Enfermedad grave
3. Capacidad para comprender la información sobre el ensayo y cumplir con las visitas	3. Tratamiento con fármacos en los 15 días previos al estudio
4. Análisis de los marcadores bioquímicos de estudio dentro del rango de normalidad	4. Fumador
5. No historia previa de consumo de drogas de abuso	5. Consumidor de una cantidad de alcohol superior al consumo responsable (8 copas de vino, 8 tercios de cerveza o 4 combinados a la semana)
6. Serologías VHC, VHB, VIH: negativas	6. Consumidor de cualquier sustancia que pueda afectar al sistema inmunológico y al balance oxidativo (complementos nutricionales con antioxidantes o para aumentar el rendimiento físico y/o la masa muscular)
7. Para las mujeres: prueba negativa de embarazo	7. Hipersensibilidad conocida al altramuza
8. Firmar el documento de consentimiento informado	8. Antecedentes de alergias a derivados vegetales y celíacos
	9. Participación en otro ensayo clínico en los tres meses previos
	10. Donación de sangre en los tres meses previos
	11. Para las mujeres: estar embarazada o en período de lactancia

Se reclutaron un total de 33 voluntarios y el estudio se realizó entre septiembre y noviembre de 2015. Los sujetos ingirieron diariamente en ayunas 200 mL de la bebida experimental durante 28 días. Antes de la primera ingestión, se tomó una muestra de sangre periférica para cuantificar las variables basales del estudio (día 0). A lo largo del estudio se tomaron dos muestras de sangre cada dos semanas, días 14 y 28 (fin del ensayo). Las muestras sanguíneas se tomaron a los voluntarios en ayunas entre las 8:00 y las 9:00 de la mañana en el Servicio de Bioquímica Clínica del HUVR. Las muestras se recogieron en tubos VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator tubes (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) para los análisis de marcadores bioquímicos; en tubos VACUETTE® K3EDTA tubes (Greiner bio-one) para el análisis de las células blancas; y en tubos CPT™ tubes (BD) para el posterior aislamiento de las PBMCs. También se recogió una muestra de la primera orina del día en tubos VACUETTE® urine tubes (Greiner bio-one).

### **4.2.3 ANÁLISIS DE LA SALUD DE LOS PARTICIPANTES**

Para evaluar el estado de salud física y mental de los participantes se empleó el cuestionario short form-36 (SF-36) (67) (Anexo 3). El cuestionario se proporcionó y rellenó al comienzo (día 0) y al final del estudio (día 28). La calificación resultante se obtuvo mediante dos pasos. En primer lugar, a las respuestas de cada pregunta se les asignó un valor numérico (entre 0 y 100) (Tabla 3 A). Todos los ítems se calificaron de manera que un puntaje alto definiera un estado de salud más favorable. En el paso 2, se agruparon los

ítems que pertenecían a una misma escala (bienestar emocional, miedo, salud general, etc.) (Tabla 3 B) y se calculó la media.

**Tabla 3. Análisis del cuestionario SF-36.**

**A.**

Pregunta número	Respuesta número	Puntuación obtenida
1, 2, 20, 22, 34, 36	1	100
	2	75
	3	50
	4	25
	5	0
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	1	0
	2	50
	3	100
13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	1	0
	2	100
21, 23, 26, 27, 30	1	100
	2	80
	3	60
	4	40
	5	20
	6	0
24, 25, 28, 29, 31	1	0
	2	20
	3	40
	4	60
	5	80
	6	100
32, 33, 35	1	0
	2	25
	3	50
	4	75
	5	100

**B.**

Escala	Número de ítems	Preguntas
Función física	10	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
Limitaciones debidas a salud mental	4	13, 14, 15, 16
Limitaciones debidas a problemas emocionales	3	17, 18, 19
Energía/Fatiga	4	23, 27, 29, 31
Bienestar emocional	5	24, 25, 26, 28, 30
Funcionamiento social	2	20, 32
Miedo	2	21, 22
Salud general	5	1, 33, 34, 35, 36
Cambio de salud	1	2

Tabla de referencia para la asignación de un valor numérico a las respuestas de cada pregunta (A) y tabla para agrupar las diferentes preguntas en una misma escala (B).

#### 4.2.4 ANÁLISIS SOBRE LA ACEPTABILIDAD DE LA BEBIDA

Para analizar la percepción del sabor de la bebida por los voluntarios, a los 14 días y 28 días tras el comienzo de la ingesta se les proporcionó el test de Likert (Tabla 4). Este test se utiliza ampliamente para evaluar la aceptabilidad de un producto. El test consta de una escala de 7 puntos, considerando el valor 1 como “extremamente desagradable” y el valor 7 como “muy agradable”.

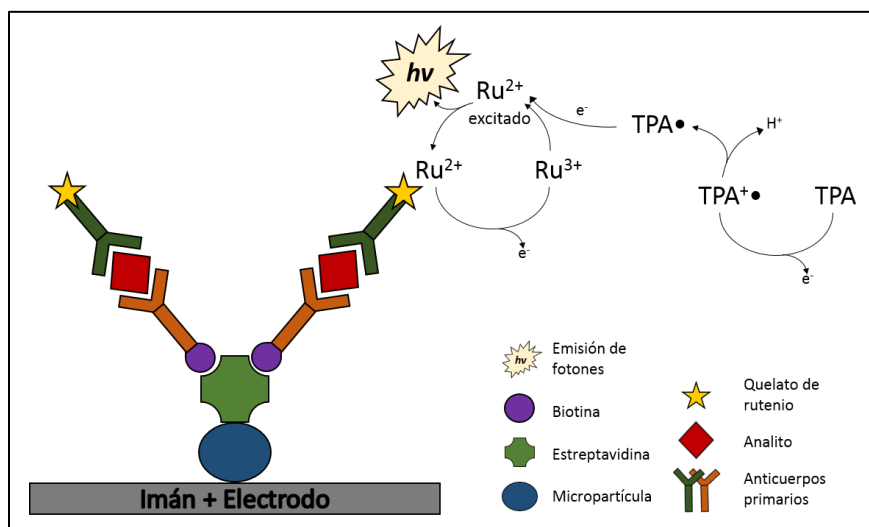
**Tabla 4. Test de Likert.**

Sabor	Escala
Extremadamente desagradable	1
Bastante desagradable	2
Algo desagradable	3
Ni agradable ni desagradable	4
Un poco agradable	5
Bastante agradable	6
Muy agradable	7

#### 4.2.5 MEDICIONES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Los marcadores bioquímicos se analizaron en muestras de suero mediante un sistema totalmente automatizado basado en una reacción antígeno-anticuerpo y electroquimioluminiscencia mediante los analizadores COBAS, módulo c702 y módulo e602 (Roche Diagnostics). Este método se basa en la detección de un analito mediante reconocimiento por parte de un anticuerpo primario específico marcado con biotina y de otro marcado con quelato de rutenio, formando de esta manera un complejo sándwich (anticuerpo primario-analito-anticuerpo con quelato de rutenio). Posteriormente se añadieron micropartículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina que se unieron a la biotina de los anticuerpos. Por magnetismo las micropartículas se fijaron a un electrodo. Se añadió un agente reductor (el tripropilamina, TPA) y se aplicó una corriente eléctrica dando inicio a la reacción. El rutenio pasó de su estado fundamental  $\text{Ru}^{2+}$  a  $\text{Ru}^{3+}$ , y el TPA pasó a

ser un catión radical intermedio  $\text{TPA}^{\bullet+}$ . El  $\text{TPA}^{\bullet+}$  reaccionó con  $\text{Ru}^{3+}$ , excitándolo. El rutenio en su forma excitada, al volver a su estado fundamental  $\text{Ru}^{2+}$ , liberó luz. Esta reacción se repitió tantas veces como TPA se añadió, ya que éste es consumido durante la reacción y no se regenera. Por último, esta señal luminosa fue detectada por un fotomultiplicador. La señal detectada fue así equivalente a la concentración del analito que se quería estudiar (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema representativo del principio de la técnica de electroquimioluminiscencia utilizada para medir los parámetros bioquímicos.**

Una vez formado el complejo sándwich anticuerpo primario-analito-anticuerpo con quelato de rutenio, éste es inmovilizado, mediante la interacción de la biotina con la estreptavidina que recubre las partículas magnéticas, en un soporte imantado y con un electrodo. A la hora de aplicar una corriente, ésta convierte el TPA a un catión radical y oxida el rutenio a  $\text{Ru}^{3+}$ . El catión reacciona con  $\text{Ru}^{3+}$ , excitándolo ( $\text{Ru}^{2+}$  excitado). Cuando el  $\text{Ru}^{2+}$  excitado vuelve a su estado fundamental, éste emite luz.  $e^-$ , electrón;  $h\nu$ , emisión de luz; Ru, rutenio; TPA, tripropilamina;  $\text{TPA}^{\bullet+}$ , catión radical intermedio del TPA.



Los parámetros bioquímicos renales se cuantificaron en muestras de orina mediante el analizador Beckman Coulter AU2700 (Beckman Coulter, Brea, USA). Los hemogramas se analizaron por citometría de flujo utilizando el equipo SYSMEX XE 5000 Hematology Analyzer (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Alemania).

Todas las mediciones de los parámetros bioquímicos fueron llevadas a cabo en el Servicio de Bioquímica Clínica, del HUVR, Sevilla.

#### **4.2.6 CULTIVO CELULARES**

Los cultivos celulares de las PBMCs de los voluntarios se realizaron como se ha descrito previamente (apartado 4.1.2).

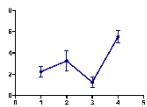
#### **4.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se representaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de los datos brutos o en porcentaje respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el software estadístico IBM SPSS® Statistics versión 24 (IBM, Armonk, NY, USA). En primer lugar, si el tamaño muestral (n) era mayor o igual a 30, se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, si la n era menor de 30 se analizó la normalidad mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se exploraron los datos para determinar y eliminar los outliers extremos, mientras que se dejaron en el análisis los outliers leves.

Por último, se aplicaron diferentes tests dependiendo del tipo de muestra que se iba a analizar. Ya que todos los datos no seguían una distribución normal, se aplicaron test no paramétricos. Los test no paramétricos utilizados en este estudio fueron pareados ya que cada condición tenía su propio control. De esta forma se utilizó el test de Wilcoxon para comparar dos variables, o el test de Friedman si las variables eran más de dos. En los análisis de los datos de expresión génica y de los datos transformados en porcentaje se utilizó el test no paramétrico para variables independientes U de Mann-Whitney.

Las correlaciones se analizaron mediante la correlación no paramétrica de Spearman.

Valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Gráficamente, la significancia se indicó con uno o más asteriscos (\*):  
\*=  $p \leq 0.05$ ; \*\*=  $p \leq 0.01$  y \*\*\*=  $p \leq 0.001$ .



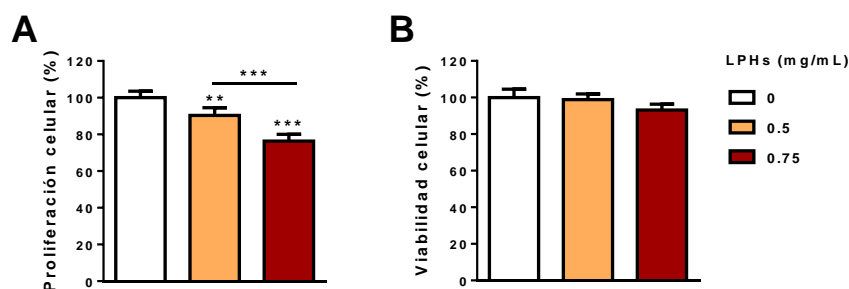
## 5. RESULTADOS

---



### 5.1 Los LPHs reducen la proliferación celular estimulada con PHA sin ser citotóxicos

El ensayo de proliferación usando BrdU mostró que los LPHs redujeron de forma significativa la proliferación celular estimulada por PHA tanto a la concentración de 0.5 mg/mL, como a 0.75 mg/mL (Fig. 4 A). Con el fin de determinar si los efectos observados sobre la proliferación se debían a una acción citotóxica de los hidrolizados, se realizó un ensayo de viabilidad celular usando el reactivo WST-1 que mostró que a ninguna de las concentraciones ensayadas los LPHs ejercieron un efecto citotóxico (Fig. 4 B).



**Figura 4. Análisis de la proliferación y de la viabilidad celular.** Media $\pm$ SEM de los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de proliferación (A) y viabilidad (B), referidos como porcentaje respecto a la condición control (sin LPHs). Células estimuladas (A) o no (B) con PHA durante 72 horas fueron tratadas con las concentraciones indicadas de LPHs. \*\*,  $p \leq 0.01$ , \*\*\*,  $p \leq 0.001$ , respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). LPHs, hidrolizados proteicos de altramu; PHA, fitohemaglutinina-P.

## **5.2 Los LPHs disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias del perfil Th1**

Para determinar los posibles efectos inmunológicos de los hidrolizados, se determinaron los niveles de varias citoquinas pro- y antiinflamatorias en sobrenadantes de PBMCs estimuladas con PHA y tratadas con LPHs a las concentraciones indicadas.

Como se muestra en la Tabla 5, los LPHs, a las dos concentraciones testadas, fueron capaces de disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias del perfil Th1, como la IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF. Los niveles de IL-17 también se redujeron significativamente tras la incubación con los LPHs. Además, el tratamiento con los LPHs fue capaz de disminuir la producción de IL-9 de forma significativa.

También se analizaron las citoquinas del perfil Th2, como la IL-4 y la IL-13. Aunque no hubo una alteración de los niveles de IL-4, la producción de IL-13 disminuyó tras el tratamiento de las PBMCs con los LPHs.

Finalmente, se estudió el efecto de los LPHs sobre la producción de la IL-10, una citoquina generalmente considerada antiinflamatoria, observándose que los LPHs disminuyeron significativamente su producción (Tabla 5).

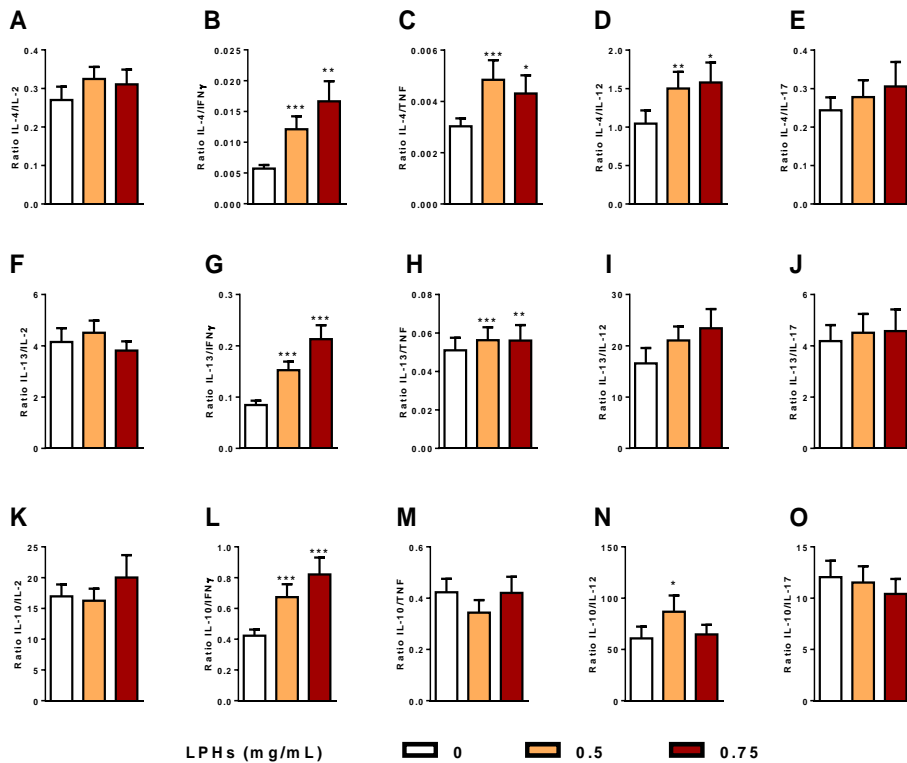
**Tabla 5. Cuantificación de la producción de citoquinas de los perfiles Th1, Th2, Th9, Th17 con los hidrolizados LPHs.**

	LPHs		
	0 mg/mL	0.5 mg/mL	0.75 mg/mL
<b>IL-2 (pg/mL)</b>	207.30±30.98	<b>140.30±14.86***</b>	<b>137.00±14.84**</b>
<b>IL-12 (pg/mL)</b>	88.87±12.01	<b>43.59±5.45***</b>	<b>40.91±5.75***</b>
<b>IFN-γ (ng/mL)</b>	7.70±0.87	<b>5.22±0.79***</b>	<b>4.28±0.74***</b>
<b>TNF (ng/mL)</b>	14.84±2.00	<b>10.96±1.44***</b>	<b>10.87±1.47***</b>
<b>IL-17 (pg/mL)</b>	337.90±49.55	<b>242.60±38.70***</b>	<b>233.10±39.30*</b>
<b>IL-9 (pg/mL)</b>	215.20±20.78	<b>155.30±15.84***</b>	<b>141.20±13.42***</b>
<b>IL-4 (pg/mL)</b>	63.29±6.10	57.24±6.14	56.04±7.07
<b>IL-13 (pg/mL)</b>	976.80±113.10	<b>762.90±84.12***</b>	<b>714.50±78.30***</b>
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	2111.00±242.90	<b>1690.00±204.20***</b>	<b>1592.00±199.60***</b>

Media±SEM de los niveles de producción de citoquinas de los distintos perfiles Th, cuantificadas con el Kit FlowCytomix en sobrenadantes de células PBMCs, cultivadas durante 48h, estimuladas con PHA y tratadas con las concentraciones indicadas de LPHs. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). IFN-γ, interferón-γ; IL, interleuquina; LPHs, hidrolizados proteicos de altramuz; PHA, fitohemaglutinina-P; TNF, factor de necrosis tumoral.

### 5.3 Los LPHs desplazan el balance pro-/antiinflamatorio hacia un fenotipo más protector

A pesar del hecho que la producción de IL-4 no se vio afectada tras el tratamiento con los hidrolizados y que los niveles de IL-13 e IL-10 disminuyeron tras el tratamiento con los LPHs, al valorar el balance anti-/proinflamatorio se observó que los LPHs aumentaron de forma significativa los ratios entre las citoquinas Th2, IL-4 (Fig. 5 A-E) e IL-13 (Fig. 5 F-J), y las citoquinas del perfil Th1. Además, el tratamiento con LPHs aumentó el ratio IL-10/IFN- $\gamma$  e IL-10/IL-12 (Fig. 5 L, N).



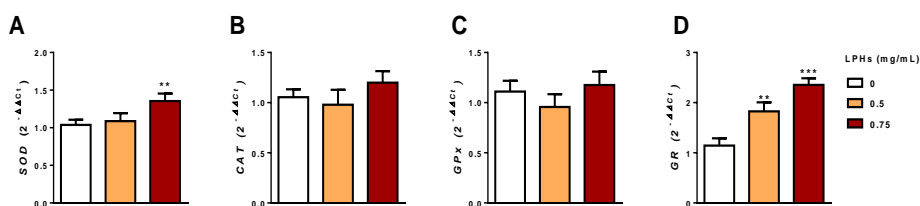
**Figura 5. Análisis de los ratios entre citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias.** Media $\pm$ SEM de los ratios entre los niveles de las citoquinas antiinflamatorias (IL-4, A-E;



IL-13, F-J; IL-10, K-O) y los niveles de las citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12, IL-17). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleuquina; LPHs, hidrolizados proteicos de altramu; TNF, factor de necrosis tumoral.

#### 5.4 Los LPHs aumentan la capacidad antioxidante de las PBMCs

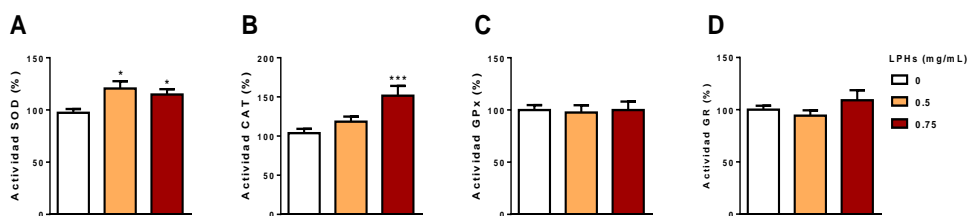
Para evaluar los posibles efectos de los hidrolizados sobre el estrés oxidativo celular, analizamos los niveles de expresión del ARN mensajero (mRNA) de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GR. El tratamiento con los LPHs aumentó de forma significativa los niveles de mRNA de SOD y GR, sin modificar los de CAT y GPx (Fig. 6).



**Figura 6. Análisis de la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes.**

Media $\pm$ SEM de los valores de expresión génica calculados con el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Expresión génica de los genes SOD (A), CAT (B), GPx (C) y GR (D). \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). CAT, catalasa; GPx, glutatión reductasa; GR, glutatión reductasa; LPHs, hidrolizados proteicos de altramu; SOD, superóxido dismutasa.

Tras el análisis de la expresión génica de las enzimas antioxidantes, estudiamos el efecto de los LPHs sobre su actividad enzimática. A ambas concentraciones testadas fueron capaces de aumentar significativamente la actividad enzimática de la SOD (Fig. 7 A), mientras que solo a la concentración más elevada (0.75 mg/mL) se pudo observar un aumento de la actividad de CAT (Fig. 7 B). El tratamiento con los LPHs no modificó las actividades de la GPx y GR (Fig. 7 C, D).



**Figura 7. Análisis de las actividades de las enzimas antioxidantes estudiadas.**

Media $\pm$ SEM de los valores en porcentaje de la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Actividad enzimática de las enzimas SOD (A), CAT (B), GPx (C) y GR (D). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). CAT, catalasa; GPx, glutatión reductasa; GR, glutatión reductasa; LPHs, hidrolizados proteicos de altramuz; SOD, superóxido dismutasa.

Además, observamos una significativa correlación positiva entre las actividades de la SOD y la CAT y entre las actividades GPx y GR tras el tratamiento de las PBMCs con 0.75 mg/mL de LPHs (Tabla 6). Asimismo, la

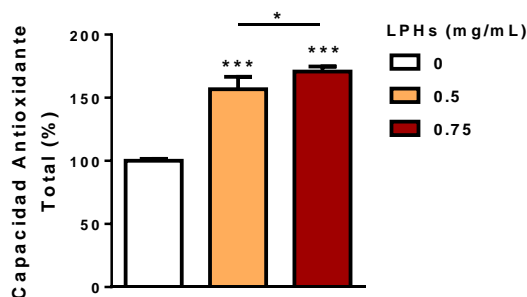
actividad GPx correlacionó negativamente con la actividad de la SOD y de la CAT (Tabla 6).

**Tabla 6. Correlaciones entre las distintas actividades enzimáticas con los hidrolizados LPHs.**

	CAT		GPx		GR		TAC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<b>SOD</b>	0.50	<b>0.006</b>	-0.61	<b>0.007</b>	-0.05	0.80	0.66	<b>0.001</b>
<b>CAT</b>			-0.62	<b>0.006</b>	-0.23	0.24	0.49	<b>0.021</b>
<b>GPx</b>					0.68	<b>0.002</b>	-0.89	<b>&lt;0.001</b>
<b>GR</b>							-0.62	<b>0.002</b>

Correlaciones no paramétricas de Spearman entre las distintas actividades enzimáticas a una concentración de 0.75 mg/mL LPHs. CAT, catalasa; GPx, glutatión reductasa; GR, glutatión reductasa; LPHs, hidrolizados proteicos de altramu; p, p-valor; r, coeficiente de correlación; SOD, superóxido dismutasa.

Para determinar el efecto general de los LPHs sobre el estado antioxidante general, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico para determinar la TAC. A ambas concentraciones ensayadas se pudo observar un aumento significativo de la TAC (Fig. 8).



**Figura 8. Análisis de la capacidad antioxidante total.** Media $\pm$ SEM de los valores en porcentaje respecto a la condición sin LPHs de la actividad antioxidante total, medida en muestras tratadas con LPHs. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control sin hidrolizado (0 mg/mL). LPHs, hidrolizados proteicos de altramuiz.

En presencia de los LPHs a 0.75 mg/mL, también pudimos observar una significativa correlación positiva entre la TAC y las actividades SOD y CAT (Tabla 6). De forma opuesta, se observó una correlación negativa entre la TAC y la GPx o GR (Tabla 6).

Tras observar los efectos inmunomoduladores y antioxidantes de los LPHs *in vitro*, formulamos una bebida experimental basada en los hidrolizados con el fin de testar su seguridad y eficacia en voluntarios sanos mediante el ensayo alimentario Lupine-1.

### 5.5 La bebida experimental no modifica el peso corporal de los voluntarios a lo largo del ensayo.

A lo largo de las 4 semanas de estudio no se observó ninguna modificación significativa en el peso corporal de los voluntarios, ni en la población total, ni segregada por sexo (Tabla 7). Asimismo, la bebida no afectó al IMC de los voluntarios a lo largo del estudio (Tabla 7).

**Tabla 7. Peso corporal e IMC a lo largo del ensayo.**

	Ref.	Total			Hombres			Mujeres		
		Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
<b>Peso (kg)</b>		65.8 ±1.9	66.1 ±1.9	66.2 ±1.9	73.4 ±2.8	73.7 ±2.8	74.0 ±2.8	58.6 ±0.9	58.9 ±1.0	58.8 ±1.0
<b>IMC</b>	19-26	22.7 ±0.4	22.8 ±0.4	22.8 ±0.4	23.8 ±0.8	23.9 ±0.7	23.9 ±0.7	21.7 ±0.3	21.8 ±0.3	21.7 ±0.3

Media±SEM del peso corporal medido en los días 0, 14 y 28 del ensayo y el IMC calculado. Se considera a la población entera de estudio (total) o separada según el sexo (hombres, mujeres). \*,  $p \leq 0.05$  respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). IMC, índice de masa corporal; Ref., valores de referencia.

### **5.6 La bebida experimental no altera los parámetros generales del estatus de salud física y mental**

Tanto el estado físico como el estado mental, se evaluaron a través del cuestionario SF-36. Los resultados obtenidos (Tabla 8) evidenciaron que, tras los 28 días de ingesta, no se observó ningún cambio en el estado psico-físico de los voluntarios, comparado con su estado previo al comienzo del ensayo (día 0). De esta forma, se pudo comprobar que la bebida no alteró el estado de salud percibido por los voluntarios.

Tabla 8. Análisis del cuestionario SF-36.

A.

		Total			Hombres			Mujeres		
CRITERIOS		Día 0	Día 28	p-valor	Día 0	Día 28	p-valor	Día 0	Día 28	p-valor
SALUD FÍSICA	Funcionamiento físico	97.19 ±1.77	97.34 ±1.75	0.739	99.33 ±0.45	99.67 ±0.33	0.564	95.29 ±3.28	95.29 ±3.25	1.000
	Limitación por problemas físicos	100.00 ±0.00	95.31 ±3.45	0.180	100.00 ±0.00	100.00 ±0.00	1.000	100.00 ±0.00	91.18 ±6.41	0.180
	Dolor corporal	90.00 ±2.18	88.12 ±3.06	0.355	92.00 ±2.43	93.67 ±3.06	0.670	88.23 ±3.53	83.23 ±4.87	0.072
	Percepción general de la salud	82.97 ±2.42	83.59 ±2.27	0.907	88.33 ±1.99	88.00 ±1.81	0.856	78.23 ±3.90	79.71 ±3.77	0.964

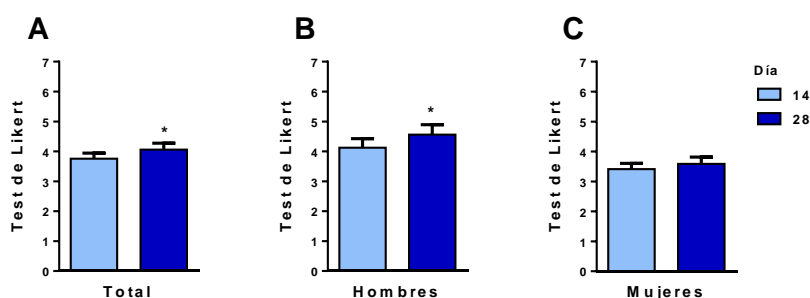
B.	CRITERIOS	Total			Hombres			Mujeres		
		Día 0	Día 28	p-valor	Día 0	Día 28	p-valor	Día 0	Día 28	p-valor
SALUD MENTAL	Vitalidad, energía o fatiga	63.75± 2.32	64.22± 2.42	0.949	62.67± 3.54	60.17± 4.29	0.609	64.71± 3.14	67.79± 2.34	0.361
	Funcionamiento del rol social	95.70± 1.91	93.36± 1.86	0.161	93.33± 3.63	92.50± 3.18	0.666	97.79± 1.60	94.12± 2.17	0.096
	Limitación por problemas emocionales	90.62± 3.74	92.71± 3.88	0.483	88.89± 5.31	86.67± 7.83	1.000	92.16± 5.37	98.04± 1.96	0.180
	Bienestar emocional	55.62± 2.29	58.37± 2.16	0.334	55.47± 3.09	58.67± 3.81	0.528	55.76± 3.44	58.12± 2.41	0.343
	Cambio de salud	56.25± 2.51	56.06± 2.67	1.000	58.33± 3.98	56.25± 4.27	0.564	54.41± 3.20	55.88± 3.41	0.317

Media±SEM de los resultados obtenidos en el cuestionario SF-36, comparando el día de fin del estudio (día 28) con el día de comienzo, antes de empezar a ingerir la bebida (día 0). Estudio de la salud física (A) y mental (B). Se considera la población entera de estudio (total) o separada según el sexo (hombres, mujeres). p-valor respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0).



### 5.7 La bebida experimental se tolera bien y no presenta efectos adversos

Para evaluar la aceptabilidad de la bebida, se empleó el test de Likert, un test ampliamente utilizado para estimar el grado de satisfacción de un producto. Como se muestra en la Figura 9, la percepción del sabor de la bebida mejoró a lo largo del ensayo, especialmente en la población de hombres. Además, en ningún momento se señalaron efectos adversos por parte de los participantes ni a lo largo del estudio ni dos semanas tras la finalización del estudio.



**Figura 9. Análisis del test de Likert.** Media±SEM de la puntuación obtenida en el Test de Likert, para evaluar el sabor de la bebida. El test se proporcionó tras 14 días de ingesta de la bebida y tras 28 días. Se considera la población entera de estudio (A) o separada según el sexo (hombres, B; mujeres, C). \*,  $p \leq 0.05$  respecto a la condición control, día 14 tras la primera ingesta de la bebida.

### **5.8 La bebida experimental no modifica los biomarcadores de la función hepática y renal**

Con el fin de comprobar la seguridad de la ingestión de la bebida, se evaluó la función hepática y renal de los voluntarios mediante el análisis de parámetros bioquímicos específicos de estos dos órganos. Así, se evaluaron los niveles séricos de las transaminasas (transaminasa glutámico-oxalacética, GOT; transaminasa glutámico pirúvica, GPT; y  $\gamma$ -glutamyl-transferasa, GGT) y de la fosfatasa alcalina (ALP) como marcadores hepáticos; urea, creatinina y proteínas se evaluaron en la primera orina del día como biomarcadores renales. Como se muestra en la Tabla 9, no se observó ningún aumento significativo en los niveles de los distintos biomarcadores tras 2 o 4 semanas de ingesta de la bebida que pudiera sugerir un efecto tóxico.

Tabla 9. Cuantificación de los biomarcadores de la función hepática y renal.

A.

		Total			Hombre			Mujeres			
		Ref.	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
MARCADORES HEPÁTICOS	Proteínas Totales (g/dL)	6.50-8.00	7.46 ±0.07	<b>7.21</b> <b>±0.06**</b>	7.36 ±0.07	7.71 ±0.09	<b>7.32</b> <b>±0.09**</b>	7.57 ±0.10	7.25 ±0.08	7.11 ±0.92	7.16 ±0.06
	GGT (UI/L)	10.00-50.00	14.28 ±0.91	<b>12.94</b> <b>±0.84***</b>	13.54 ±0.88	16.60 ±1.21	<b>14.94</b> <b>±0.99**</b>	15.50 ±1.10	12.23 ±1.15	<b>11.06</b> <b>±1.18*</b>	11.71 ±1.23
	GOT (U/L)	10.00-37.00	18.27 ±0.73	17.37 ±0.71	17.97 ±1.10	19.31 ±1.09	18.27 ±1.14	20.60 ±1.85	17.29 ±0.95	16.59 ±0.85	15.65 ±1.04
	GPT (UI/L)	10.00-40.00	15.62 ±1.09	15.67 ±1.21	16.61 ±1.39	17.93 ±1.53	17.94 ±2.12	19.64 ±1.97	13.59 ±1.41	13.53 ±1.07	14.12 ±1.76
	ALP (U/L)	40.00-130.00	55.27 ±2.92	55.85 ±2.67	57.03 ±2.76	63.00 ±4.41	62.06 ±3.49	65.06 ±3.75	48.00 ±3.02	50.00 ±3.53	49.47 ±3.13

## B.

		Total				Hombre			Mujeres		
		Ref.	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
MARCADORES RENALES	Urea	1 000-	2 242.00	2 283.81	2 337.54	2 357.12	2 603.13	2 458.37	2 126.87	1 984.44	2 223.82
	(mg/dL)	3 600	±133.56	±153.92	±118.92	±212.03	±199.56	±206.42	±164.35	±211.21	±125.05
	Creatinina	30.00-	172.91	189.87	181.30	177.56	211.13	188,19	168.25	171.12	174.82
	(mg/dL)	300.00	±11.92	±13.92	±12.00	±15.72	±18.97	±19.02	±18.36	±19.55	±15.32
	Proteínas	0.00-	11.32	11.77	10.47	11.60	12.73	10.37	11.06	10.87	10.56
	(mg/dL)	10.00	±1.01	±1.20	±0.84	±1.73	±1.67	±1.11	±1.15	±1.75	±1.30

Media±SEM de los valores bioquímicos de daño hepático (proteínas totales, GGT, GOT, GPT y ALP) (A) y renal (urea, creatinina y proteínas en orina) (B) medidos en los días 0, 14 y 28 del ensayo. Se considera la población entera de estudio (total) o separada según el sexo (hombres, mujeres). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). ALP, fosfatasa alcalina; GGT,  $\gamma$ -glutamyl-transferasa; GOT, transaminasa glutámico-oxalacética; GPT, transaminasa glutámico pirúvica; Ref., valores de referencia.

### **5.9 La bebida experimental no desencadena una respuesta inmune**

Como se muestra en la Tabla 10, la administración de la bebida durante 28 días no alteró el número total de los leucocitos y de las subpoblaciones leucocitarias, aunque se observó un ligero aumento de los basófilos al final del ensayo (día 28), comparándolo con el día 0. Además, no se observaron cambios en los niveles de la proteína C reactiva (PCR) y de las inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM). Solo se observó un ligero decremento en la producción de la IgE tras 14 días de ingesta de la bebida que volvió a niveles basales a día 28 (Tabla 10).

Tabla 10. Recuentos de los glóbulos blancos y parámetros inmunológicos.

A.

		Total				Hombre			Mujeres		
		Ref.	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
RECuento de los glóbulos blancos	Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	3.80-11.50	5.68 ±0.24	5.48 ±0.22	6.04 ±0.23	5.52 ±0.26	5.53 ±0.33	5.94 ±0.33	5.83 ±0.40	5.44 ±0.31	6.14 ±0.34
	Neutrófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	2.50-7.50	3.38 ±0.18	3.05 ±0.16	3.59 ±1.73	3.21 ±0.17	3.15 ±0.25	3.46 ±0.24	3.54 ±0.31	2.96 ±0.21	3.71 ±0.25
	Linfocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	1.50-4.00	1.72 ±0.08	1.83 ±0.08	1.81 ±0.08	1.70 ±0.11	1.74 ±0.12	1.80 ±0.10	1.74 ±0.123	1.92 ±0.10	1.82 ±0.13
	Monocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.20-0.80	0.31 ±0.01	0.30 ±0.02	0.33 ±0.02	0.33 ±0.02	0.33 ±0.30	0.35 ±0.02	0.29 ±0.02	0.27 ±0.20	0.30 ±0.03
	Eosinófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.05-0.50	0.14 ±0.01	0.17 ±0.02	0.14 ±0.01	0.15 ±0.02	0.18 ±0.03	0.16 ±0.02	0.12 ±0.02	0.16 ±0.03	0.13 ±0.02
	Basófilos (x10 <sup>9</sup> /L)	0.010-0.150	0.016 ±0.00	0.016 ±0.00	<b>0.025</b> <b>±0.00*</b>	0.017 ±0.00	0.017 ±0.00	0.025 ±0.00	0.015 ±0.00	0.015 ±0.00	0.025 ±0.00

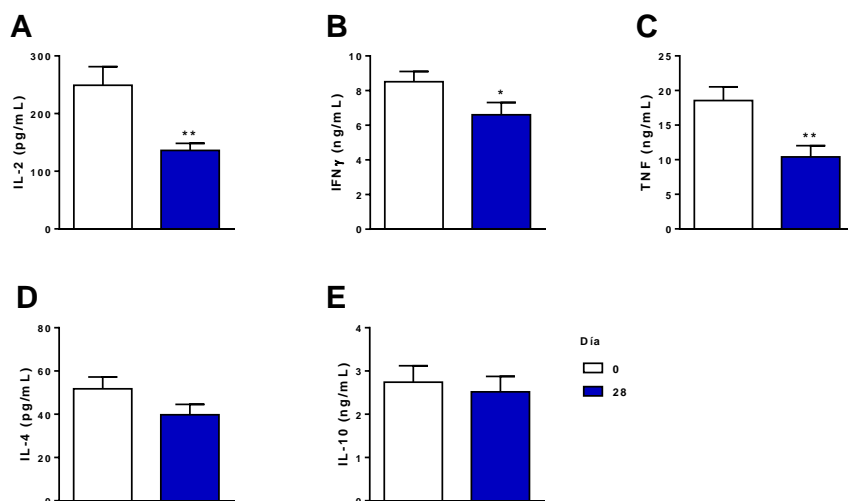
B.

		Total				Hombre			Mujeres		
		Ref.	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS	PCR (mg/L)	0.00- 5.00	0.73 ±0.12	0.72 ±0.14	0.77 ±0.15	1.49 ±0.40	0.78 ±0.15	2.82 ±0.67	1.09 ±0.20	0.75 ±0.10	1.79 ±0.39
	IgG (mg/dL)	700- 1 600	1 258.64 ±51.98	1 229.69 ±52.74	1 259.89 ±52.52	1 214.12 ±43.45	1 193.09 ±51.93	1 185.97 ±49.83	1 234.99 ±33.25	1 212.38 ±42.35	1 221.81 ±36.18
	IgA (mg/dL)	70- 400	282.33 ±21.00	276.05 ±20.26	282.81 ±21.19	239.78 ±21.86	241.38 ±21.35	241.57 ±20.96	259.72 ±15.46	258.19 ±14.84	261.56 ±15.12
	IgM (mg/dL)	40- 230	111.37 ±9.45	108.36 ±8.82	111.62 ±9.05	145.54 ±11.37	139.75 ±9.84	139.79 ±9.69	129.52 ±7.98	124.53 ±7.09	126.13 ±7.00
	IgE (mg/dL)	0- 100	58.23 ±16.95	54.65 ±13.75	60.83 ±14.76	52.85 ±18.46	<b>48.69</b> <b>±16.33**</b>	48.80 ±16.49	55.54 ±12.32	<b>51.67</b> <b>±10.50**</b>	54.82 ±10.93

Media±SEM del número de células por 10<sup>9</sup>/mL de leucocitos y sus poblaciones (A) y de los valores bioquímicos de algunos parámetros inmunológicos (PCR e inmunoglobulinas) (B) medidos en los días 0, 14 y 28 del ensayo. Se considera la población entera de estudio (total) o separada según el sexo (hombres, mujeres). \*, p≤0.05; \*\*, p≤0.01 respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). Ig, inmunoglobulina; PCR, proteína C reactiva; Ref., valores de referencia.

### 5.10 La bebida experimental reduce la respuesta proinflamatoria

Para analizar la respuesta inmunológica de las PBMCs de los participantes, tras los 28 días de tratamiento con la bebida, se cuantificó la producción de citoquinas en sobrenadantes de PBMCs cultivadas durante 48 horas y estimuladas con PHA. La ingesta de la bebida disminuyó la respuesta proinflamatoria en las PBMCs estimuladas, reduciéndose de forma significativa las citoquinas proinflamatorias del perfil Th1, como la IL-2 (Fig. 10 A), el IFN- $\gamma$  (Fig. 10 B) y el TNF (Fig. 10 C); sin afectar a la producción de las citoquinas del perfil Th2, IL-4 (Fig. 10 D) e IL-10 (Fig. 10 E).

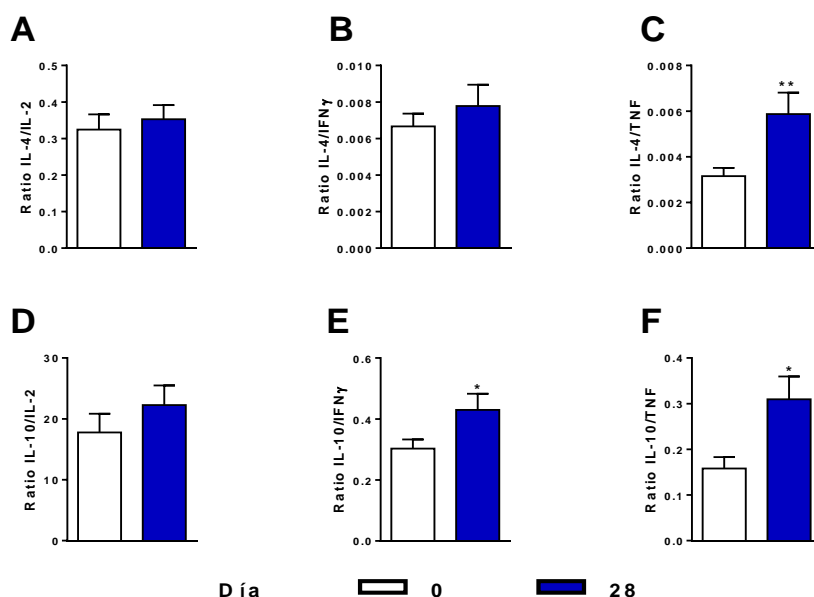


**Figura 10. Cuantificación de la producción de citoquinas.** Media $\pm$ SEM de los niveles de producción de citoquinas proinflamatorias (A-C) y antiinflamatorias (D, E) en sobrenadantes de cultivos de 48 horas de PBMCs extraídas en el día del comienzo (día 0) y fin del ensayo (día 28) y estimuladas con PHA. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$  respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). IL, interleuquina, IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; PHA, fitohemaglutinina-P; TNF, factor de necrosis tumoral.



### 5.11 La bebida experimental desplaza la respuesta Th hacia un perfil Th2

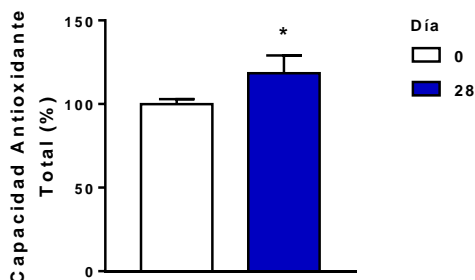
Ya que la ingesta de la bebida disminuyó la producción de citoquinas Th1 sin modificar significativamente la del perfil Th2, evaluamos el balance anti(Th2)/-pro(Th1)-inflamatorio. Tras analizar los ratios entre las citoquinas Th2 (antiinflamatorias) y Th1 (proinflamatorias), se observó que tras los 28 días de ingesta de la bebida aumentó el balance antiinflamatorio de las PBMCs, siendo significativo en el caso de los ratios IL-4/TNF (Fig. 11 C), IL-10/IFN- $\gamma$  (Fig. 11 E) e IL-10/TNF (Fig. 11 F).



**Figura 11. Ratio entre las citoquinas antiinflamatorias y las citoquinas proinflamatorias.** Media $\pm$ SEM de los ratios entre los niveles de las citoquinas antiinflamatorias (IL-4, A-C; IL-10, D-F) y los niveles de las citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$  respecto a la condición control, antes del comienzo del ensayo (día 0). IL, interleuquina, IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; TNF, factor de necrosis tumoral.

### 5.12 La ingesta de la bebida experimental aumenta la TAC de las PBMCs

Finalmente, para evaluar las posibles propiedades antioxidantes de la bebida, observadas en los ensayos *in vitro* previos utilizando los LPHs, se evaluó la TAC en los sobrenadantes de las PBMCs cultivadas durante toda la noche. Tras los 28 días de ingesta, se observó un aumento significativo en la TAC (Fig. 12).



**Figura 12. Análisis de la capacidad antioxidante total.** Media $\pm$ SEM del porcentaje de la actividad antioxidante total respecto a la media basal, medida en muestras de sobrenadantes de cultivos de 16 horas de PBMCs extraídas en el día del comienzo (día 0) y fin del ensayo (día 28). \*,  $p \leq 0.05$  respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0).

### 5.13 La bebida experimental disminuye el índice aterogénico (LDL-C/HDL-C)

Tras los 28 días de tratamiento no se observó ninguna modificación significativa en los niveles de colesterol total (TC), lipoproteínas de alta densidad de colesterol (HDL-C), lipoproteínas de baja densidad de colesterol (LDL-C) o triglicéridos (TG) (Tabla 11). En cambio, cabe resaltar que tras las 4

semanas de ingesta de la bebida se redujo de forma significativa el índice aterogénico (LDL-C/HDL-C), lo cual se debió a la población masculina, donde además se observó una disminución significativa de los niveles de TC tras los 14 días de ingesta de la bebida (Tabla 11).

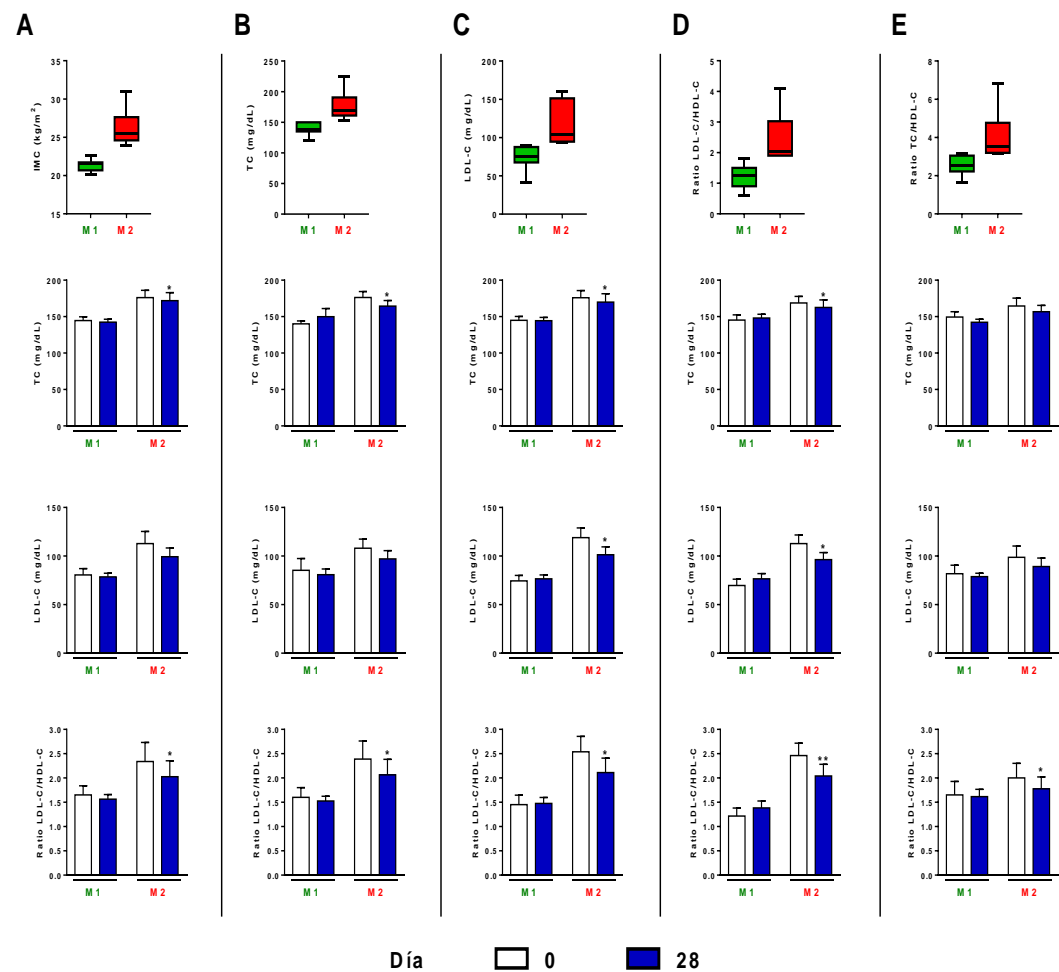
Tabla 11. Cuantificación de los biomarcadores del perfil lipídico.

		Ref.	Total			Hombre			Mujeres		
			Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28	Día 0	Día 14	Día 28
PARÁMETROS LIPÍDICOS	TC (mg/dL)	150- 200	163.97 ±4.91	163.15 ±5.67	159.87 ±4.39	159.33 ±6.66	<b>154.87</b> <b>±7.76*</b>	157.12 ±6.84	168.06 ±7.18	165.31 ±6.05	162.62 ±5.63
	HDL-C (mg/dL)	39-60	60.06 ±2.40	59.67 ±2.52	59.45 ±2.35	53.25 ±3.70	49.19 ±2.98	52.81 ±3.43	66.87 ±1.97	69.53 ±2.10	65.71 ±2.45
	LDL-C (mg/dL)	80- 140	92.62 ±5.27	90.94 ±4.81	89.29 ±4.78	96.62 ±8.00	91.37 ±6.40	88.87 ±5.44	84.27 ±5.82	90.53 ±7.32	89.73 ±8.21
	TG (mg/dL)	70- 170	62.22 ±4.51	62.73 ±4.20	72.56 ±4.48	69.40 ±7.91	71.44 ±6.99	77.19 ±6.40	55.88 ±4.53	54.53 ±4.11	73.76 ±8.27
	Ratio LDL-C/HDL-C	0-3	1.67 ±0.14	1.62 ±0.11	<b>1.60</b> <b>±0.12*</b>	1.99 ±0.23	1.94 ±0.17	<b>1.68</b> <b>±0.14**</b>	1.34 ±0.10	1.32 ±0.11	1.39 ±0.14

Media±SEM de los valores bioquímicos de los parámetros lipídicos (TC, HDL-C, LDL-C, TG, LDL-C/HDL-C) medidos en los días 0, 14 y 28 del ensayo. Se considera la población entera de estudio (total) o separada según el sexo (hombres, mujeres). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ , respecto a la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). HDL-C, lipoproteínas de alta densidad de colesterol; LDL-C, lipoproteínas de baja densidad de colesterol; Ref., valores de referencia; TC, colesterol total; TG, triglicéridos.

#### **5.14 La bebida experimental disminuye los niveles de metabolitos lipídicos en los voluntarios varones con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares**

Para obtener información adicional sobre los efectos de la bebida en los hombres, se evaluó el efecto de la bebida sobre los biomarcadores lipídicos en los sujetos con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV), definidos por aquellos que presentaban altos valores de IMC, TC, LDL-C, índice aterogénico y del ratio TC/HDL-C. Se consideraron valores altos aquellos niveles basales (día 0, antes de la primera ingesta de la bebida) que estaban por encima de la mediana calculada para cada parámetro anteriormente mencionado (grupo M2). Como se puede observar en la Figura 13, la ingesta de la bebida disminuyó los marcadores lipídicos en aquellos hombres que pertenecían al grupo con mayor riesgo de padecer ECV (grupo M2). Independientemente del factor de riesgo considerado, la ingesta de la bebida disminuyó de forma significativa el índice aterogénico con respecto a los valores basales en el grupo M2. Además, la bebida fue capaz de disminuir el TC en aquellos hombres con altos valores de IMC, TC, LDL-C o de índice aterogénico y también se observó una disminución de los niveles de LDL-C en aquellos hombres con altos valores de LDL-C e índice aterogénico (Fig. 13).



**Figura 13. Análisis del TC, de la LDL-C y del índice aterogénico en los voluntarios con un posible riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.** Media±SEM de los valores bioquímicos de los parámetros lipídicos (TC, LDL-C, LDL-C/HDL-C) medidos en los días 0 y 28 del ensayo y calculados según si estaban por encima (M2) o por debajo (M1) de la mediana calculada en los valores basales para cada parámetro considerado como factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares. Cálculo de la mediana y sus correspondientes cambios en los resultados lipídico según IMC (A), TC (B), LDL-C (C), LDL-C/HDL-C (D) y TC/HDL-C (E). Se considera únicamente la población de hombres. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$  entre el día 28 y la condición control, antes de empezar el ensayo (día 0). HDL-C, lipoproteínas de alta densidad de colesterol; IMC, índice de masa corporal; LDL-C, lipoproteínas de baja densidad de colesterol; TC, colesterol total.



## 6. DISCUSIÓN

---





Este estudio muestra los potenciales efectos beneficiosos de los LPHs obtenidos mediante la hidrólisis de proteínas aisladas del altramuz (*Lupinus angustifolius*) con la enzima alimentaria Alcalasa 2.4 L, sobre el estado inmunológico y oxidativo de PBMCs procedentes de voluntarios sanos. Los LPHs ejercieron dos acciones diferenciadas. Por un lado, disminuyeron la proliferación celular y las respuestas Th1, Th17 y Th9, desplazando el balance de citoquinas pro-/antiinflamatorias hacia un fenotipo protector y, por otro lado, el tratamiento con los LPHs aumentó las actividades SOD y CAT lo cual aumentó la capacidad antioxidante total de las células en presencia de los hidrolizados.

La ausencia de efectos sobre la viabilidad celular tras el tratamiento con los LPHs indica que la inhibición de la proliferación, así como sobre la producción de citoquinas, no están relacionados con efectos citotóxicos. Estos resultados son coherentes con un estudio previo en el cual se describió la ausencia de toxicidad de los LPHs en M $\phi$ -THP-1 (65).

El efecto de los LPHs puede radicar en que la hidrólisis enzimática libera fragmentos (péptidos), que originalmente están secuestrados en la proteína entera, y que pueden tener una función biológica importante (68). Es evidente que el tipo de enzima que se emplea durante la hidrólisis enzimática determina el tipo de fragmento que se pueda liberar de la proteína entera. De esta manera, se seleccionó la Alcalasa 2.4 L, ya que, en estudios previos, se había demostrado que poseía mayor eficacia y que era de más fácil uso con respecto a otras peptidasas (66).

Como se ha demostrado en investigaciones recientes, algunos péptidos derivados de los alimentos pueden influenciar la respuesta inmune (10, 11, 41). En este sentido, proteínas recombinantes  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3-, y  $\beta$ 6-conglutinas de *Lupinus angustifolius* han mostrado un efecto inhibitor sobre la producción de IL-1 $\beta$  y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en PBMCs cultivadas *in vitro* procedentes de pacientes con diabetes de tipo 2 (69). Además, recientemente se han descrito efectos inhibidores de los LPHs sobre la producción de TNF en M $\phi$ -THP-1 y su capacidad para aumentar la expresión del mRNA de CCL18 (65), una quimioquina asociada al perfil Th2 (70).

Los resultados de la presente tesis doctoral apoyan los efectos antiinflamatorios de los LPHs, demostrando que estos efectos no solo ocurren por medio de la disminución de los niveles de TNF, sino también mediante un descenso en la producción de las citoquinas del perfil Th1, la IL-2, la IL-12 y el IFN- $\gamma$ . Algunos autores también han demostrado que los hidrolizados procedentes de fuentes animales y vegetales pueden disminuir la producción del TNF y/o del IFN- $\gamma$ . Por ejemplo, extractos de *Salvia plebeian* e hidrolizados de proteínas de la soja inhiben marcadores inflamatorios, como el NO y el TNF, producido por la línea celular de M $\phi$  de ratón RAW 264.7 (11, 71). Además, hidrolizados de algas rojas marinas (*Porphyra columbina*) muestran efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la producción de TNF e IFN- $\gamma$  y mediante el aumento de la producción de IL-10 en esplenocitos de rata estimulados con LPS y concanavalina A, un mitógeno vegetal (72). Por el contrario, un producto de la digestión gastrointestinal simulada

procedente de la leche, enriquecido con una fracción rica en proteínas procedentes de grano gastado, principal subproducto de la industria cervecera, no ejerció ningún efecto sobre la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  o TNF en linfocitos T de la línea celular Jurkat o en M $\phi$  de la línea RAW 264.7 (73).

Aunque en nuestro estudio se muestra que los LPHs disminuyeron los niveles de IL-10 e IL-13, sin afectar a los niveles de IL-4, es importante destacar que el tratamiento con los LPHs aumentó de forma significativa los ratios de IL-4/IFN- $\gamma$ , IL-4/TNF, IL-4/IL-12, así como los ratios IL-13/IFN- $\gamma$ , IL-13/ TNF e IL-10/IFN- $\gamma$ . Una de las funciones de la IL-4 es retroalimentar de forma positiva el mantenimiento de la subpoblación de las células Th2, además de estar implicada en la activación de las células B y de diferenciarlas en células plasmáticas (74). La IL-13 posee una actividad similar, pero ésta es incapaz de dirigir la diferenciación hacia el perfil Th2 (74). El exceso de producción de la IL-13 se ha encontrado en los pulmones de sujetos humanos asmáticos (75), y se ha demostrado recientemente que extractos de las partes aéreas de *Salvia plebeian* son capaces de reducir los niveles de IL-4 e IL-13 en un modelo de ratón asmático (71).

La IL-10 está implicada en el bloqueo de la síntesis de citoquinas y en suprimir la respuesta inflamatoria, limitando así el potencial daño tisular causado por la inflamación (26). Aunque algunos estudios han descrito que hidrolizados de caseína (76) o de algas marinas (77) pueden aumentar la producción de la IL-10 en la línea celular Jurkat de células T y en linfocitos de ratas, en los trabajos previos usando los mismos LPHs utilizados en la presente

tesis doctoral no se ha detectado variación alguna ni del mensajero ni de la proteína de IL-10 en M $\phi$ -THP-1 (65). En el presente estudio, la bajada de los niveles de IL-10 podría estar asociada con la disminución, por parte del tratamiento con los LPHs, de las respuestas Th2 y Th9 ya que estas dos subpoblaciones también pueden producir IL-10 (26).

Por lo tanto, este estudio es el primero que describe que los LPHs inclinan el balance de citoquinas Th1/Th2 hacia un fenotipo protector Th2 en un sistema basado en células humanas.

Ya que las células Th17 están implicadas en la respuesta inflamatoria y autoinmune (23) así como en la patogénesis de alergias alimentarias (24), decidimos explorar los posibles efectos de los LPHs sobre la producción de IL-17. Como en el caso de las células Th1, los LPHs disminuyeron la respuesta Th17, debido a un evidente decremento de los niveles de IL-17. Se ha descrito que existe una relación positiva entre los niveles de IL-17 séricos y la gravedad de la inflamación alérgica (78). Además, se encuentran altos niveles de IL-17 sérica en pacientes con hipersensibilidad a la alergia alimentaria respecto a los sujetos controles (24). Así, una disminución de los niveles de esta citoquina puede disminuir también la respuesta alérgica inflamatoria y contrarrestar una respuesta inflamatoria exacerbada.

Nuestros resultados muestran que los LPHs también disminuyeron la respuesta Th9, la cual está implicada en el desarrollo de enfermedades alérgicas (21). Además, se ha sugerido que la IL-9 juega un papel importante en las alergias alimentarias. De hecho, ratones deficientes para IL-9 no fueron

capaces de desarrollar una anafilaxis intestinal experimental inducida por un antígeno oral, mientras que la sobreexpresión a IL-9 indujo un fenotipo de anafilaxis intestinal (79).

En general, nuestros resultados muestran que los LPHs tienen actividad antiinflamatoria y que estos efectos se deben a la inhibición de la producción de las citoquinas proinflamatorias del perfil Th1, Th17 y Th9 más que al aumento de la producción de los mediadores antiinflamatorios, como la IL-10 o la IL-4.

Por otra parte, las citoquinas del perfil Th2, las cuales son más abundantes en proporción a las del perfil Th1 (especialmente la IL-4), podrían estar implicadas en promover o mantener la subpoblación Th2 y así inhibir la diferenciación hacia el perfil Th1.

Una vez estudiada la capacidad inmunomoduladora de los LPHs, evaluamos su capacidad para modular el estado oxidativo de las células. Así, se estudió tanto la expresión génica de los mRNA, como las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GR.

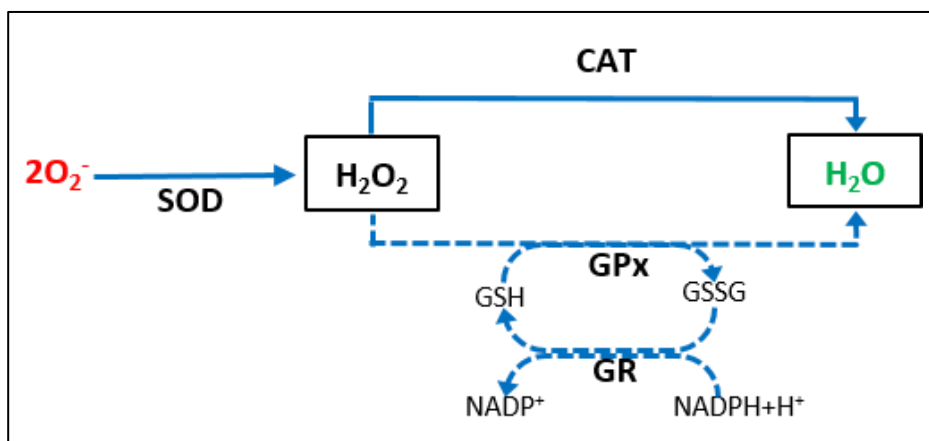
Es ampliamente conocido que muchos alimentos presentan moléculas antioxidantes (80). Distintos autores han demostrado, en sistemas *in vitro* libres de células, que hidrolizados de proteínas vegetales tienen una fuerte capacidad antioxidante. Hidrolizados proteicos de *Brassica napus* (colza) (81) y de harina de gluten de maíz (60), por ejemplo, ejercen funciones antioxidantes

en varios tests *in vitro*. En este sentido, nuestros colaboradores del Grupo de Proteínas Vegetales han demostrado que hidrolizados proteicos de *Cicer arietinum* (garbanzo) tienen actividad antioxidante y que ésta puede aumentarse mediante la selección del tipo de proteasas y del tiempo de hidrólisis (59).

Por todo ello, decidimos evaluar la capacidad antioxidante que pudieran tener los LPHs sobre las PBMCs. El tratamiento con los LPHs aumentó significativamente las actividades enzimáticas de la SOD y de la CAT, sin afectar a las actividades de la GPx y de la GR. Las enzimas SOD y CAT están implicadas directamente en la eliminación del  $O_2^-$  y del  $H_2O_2$ , respectivamente (Fig. 14). La eliminación del  $H_2O_2$  reduce la frecuencia de las reacciones de Fenton, las cuales llevan a la producción del  $\bullet OH$ , la ROS más dañina para las macromoléculas biológicas, ya que provoca mutaciones en el ADN, peroxidación de los lípidos y oxidación de las proteínas (37).

Debido al hecho de que la vía SOD/CAT es una vía independiente del GSH, nuestra hipótesis es que en presencia de los LPHs el ratio GSH/GSSG se mantiene invariable. Esto concuerda con nuestros resultados los cuales muestran que los LPHs no tienen ningún efecto sobre las actividades enzimáticas de GPx y GR. Aunque la vía GPx/GR no se afectó por los LPHs, la TAC mejoró significativamente en presencia de los hidrolizados, lo que sugiere que la vía SOD/CAT es la responsable de la mejora en el estado antioxidante celular total en nuestro sistema. De acuerdo con esto, los análisis de correlación mostraron que el aumento en la actividad de la SOD inducida por

los LPHs se acompaña de un aumento en la actividad de CAT y una disminución en la actividad de GPx. Esta última también se correlacionó negativamente con la actividad CAT. Como era de esperar, las actividades GPx y GR se correlacionaron positivamente, mientras que observamos correlaciones positivas robustas entre la TAC y, SOD y CAT, y correlaciones negativas entre la TAC y las actividades GPx y GR. Estos hallazgos también respaldan la hipótesis de que los LPHs aumentan la eliminación de las ROS a través de la vía SOD/CAT en lugar de la vía GPx/GR (Fig. 14).



**Figura 14. Esquema representativo de las vías de degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

La degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generado por acción de la SOD, puede llevarse a cabo por actividad de la CAT o por actividad de la GPx, la cual necesita la intervención de la GR para reestablecer el ratio GSH/GSSG. El resultado final es la generación de  $\text{H}_2\text{O}$ . Nuestros resultados sugieren que los LPHs aumentan la degradación de las ROS por la vía SOD/CAT (línea continua) en lugar de por la vía GPx/GR (línea discontinua). CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado;  $\text{H}_2\text{O}$ , agua;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrogeno;  $\text{NADP}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado;  $\text{NADPH}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido;  $\text{O}_2^-$ , radical superóxido; SOD, superóxido dismutasa.

En resumen, los LPHs aumentan las actividades enzimáticas de la SOD y de la CAT promoviendo un aumento de la capacidad antioxidante global. Aunque la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del altramuza ha sido descrita previamente (82), estudios recientes han mostrado que hidrolizados proteicos de guisante o altramuza, obtenidos con proteasas comerciales (alcalasa, neutrasa, flavourzyme), no han aumentado la TAC con respecto a su control (harina de guisante o altramuza, respectivamente). Solo tras una separación por cromatografía, se identificó una pequeña secuencia con fuerte capacidad antioxidante (83).

En conclusión, los ensayos *in vitro* llevados a cabo en la presente tesis doctoral muestran por primera vez que los LPHs reducen las respuestas proinflamatorias Th1, Th17 y Th9, aumentando la relación antiinflamatoria (Th2)/proinflamatoria (Th1) en las PBMCs. Asimismo, mostramos que los LPHs aumentan la TAC al mejorar las actividades de SOD y CAT.

Los resultados obtenidos en este estudio *in vitro*, junto con los obtenidos anteriormente por nuestros colaboradores (65, 66), nos llevaron a la conclusión de que los LPHs podrían representar una opción efectiva en la generación de alimentos funcionales, proporcionando así nuevas oportunidades para desarrollar estrategias nutricionales con *Lupinus angustifolius* como fuente dietética de proteínas vegetales. Por ello, el siguiente paso de la presente tesis doctoral fue generar una bebida funcional



basada en estos hidrolizados y evaluar su seguridad, tolerabilidad y eficacia sobre el estado inmunológico y antioxidante mediante un ensayo alimentario realizado en 33 voluntarios sanos (estudio Lupine-1).

El primer objetivo cuando se realiza un estudio clínico en humanos con un producto nuevo es evaluar su seguridad. La evaluación de los posibles efectos adversos de la bebida se llevó a cabo mediante la valoración de los efectos adversos comunicados por los participantes, a través del cuestionario de salud SF-36 y mediante el análisis de parámetros bioquímicos relacionados con el daño hepático y renal y de función inmune. Además, se analizaron marcadores bioquímicos del metabolismo de macromoléculas.

A lo largo del estudio ningún voluntario informó haber notado ningún efecto adverso. Además de en las visitas programadas, los voluntarios podían contactar con el equipo investigador en cualquier momento, mediante teléfono o correo electrónico, con el fin de comunicar cualquier sintomatología.

Antes de comenzar el estudio (día 0) y tras su finalización (día 28), se les evaluó el estado de salud, tanto física como mental, mediante el cuestionario SF-36. Debido a su brevedad y su exhaustividad, es un test ampliamente adoptado. El análisis de este cuestionario identifica cuatro criterios para evaluar la salud física (funcionamiento físico, limitación por problemas físicos, dolor corporal y percepción general de la salud) y cuatro para la salud mental (vitalidad, funcionamiento del rol social, limitación por

problemas emocionales y bienestar emocional). Los resultados obtenidos confirmaron que la ingesta de la bebida no causó ningún problema a nivel de salud, física o mental.

A través del estudio de los marcadores hepáticos y renales en suero y orina, pudimos confirmar que la bebida no repercutió negativamente sobre la función hepática y renal. En primer lugar, observamos que no hubo un cambio en la cantidad de proteínas totales, aunque a día 14 se detectó una leve disminución, pero siempre con valores dentro del rango de normalidad. Hay que recordar que la bebida generada contenía un 1 g de LPHs y que su ingesta continua durante 4 semanas podría aumentar los niveles de proteínas totales.

En segundo lugar se evaluaron los niveles séricos de las transaminasas, ya que un aumento en sus niveles está asociados a una alteración de la función hepática (84). No solo no se observó ningún aumento (significativo o no) en los niveles de transaminasas a lo largo del estudio, sino que incluso se registró una disminución significativa de los niveles de GGT al día 14 de estudio. Estos resultados apoyan el hecho que la bebida no afecta a la función hepática.

Por último, se evaluaron los biomarcadores de la función renal. En concreto se estudiaron en orina los niveles de urea, creatinina y proteínas. La ingesta de la bebida no afectó de ninguna forma a la función del riñón.

Una vez corroborado que la bebida no tenía efectos tóxicos sobre parámetros hepáticos y renales, evaluamos si la ingesta de ésta podría

desencadenar una respuesta inmunológica. En este sentido, la bebida no modificó el número total de leucocitos, no aumentó los niveles séricos de la PCR, un marcador inespecífico de la inflamación aguda (85), y no alteró los niveles de inmunoglobulinas. Solo se observó un leve aumento de los basófilos tras los 28 días de ingesta de la bebida, que puede deberse a la sensibilidad del equipo ya que se trata de valores muy pequeños ( $0.016 - 0.025 \times 10^9$  células/mL) y que, de cualquier manera, estaban dentro del rango de normalidad ( $0.010 - 0.150 \times 10^9$  células/mL).

Es ampliamente conocido que diferentes proteínas pertenecientes al género *Lupinus* spp. son potenciales alérgenos (86, 87). Aun así, no está claro si las reacciones alérgicas al altramuz mediadas por las IgE son debidas a la presencia de epítomos específicos (88) o son debidas a una reactividad cruzada con otras proteínas de legumbres (89). La ingesta de la bebida, durante 28 días, no provocó ninguna reacción alérgica, como se observó mediante el análisis de los niveles de IgE.

En conjunto, estos resultados muestran claramente que la ingesta de la bebida experimental durante las 4 semanas de estudio fue totalmente segura. Una prueba adicional de la seguridad del estudio fue que ninguno de los participantes abandonó el estudio y reflejaron un alto grado de satisfacción con el desarrollo del ensayo alimentario (Anexo 4).

Ya que los hidrolizados proteicos suelen tener un sabor amargo, se le añadió a la bebida un corrector del sabor con gusto a vainilla para que la

ingesta resultara más agradable. Mediante el test de Likert (90), ampliamente utilizado y aceptado en la comunidad científica para evaluar la aceptabilidad de un producto, observamos que la sensación del sabor de nuestra bebida fue mejorando a lo largo del ensayo clínico. Tras 14 días de ingesta, el sabor de la bebida fue definido por la mayoría con una puntuación de 3/7 “algo desagradable”, mientras que, pasados los 28 días de ingesta, el sabor recibió una puntuación de 4/7 “ni agradable, ni desagradable”. Es curioso que esta mejora de la percepción del sabor se debió a una mejor puntuación aportada por los hombres que participaron en el ensayo, respecto a las mujeres. Aun así, es evidente que el sabor de la bebida debe mejorarse si se quisiera comercializar.

Debido a que la composición de la bebida contenía un 5% de aceite de girasol refinado (para realizar la emulsión) y un 6% de azúcar, evaluamos si la ingesta continua durante el período de estudio pudiera afectar el peso de los voluntarios. El análisis de los pesos corporales antes de empezar el ensayo, a los 14 días del comienzo del estudio, y al final de éste (28 días), mostró que la bebida no modificó ni el peso corporal de los voluntarios ni su IMC, medida de adiposidad general (91) cuyos valores elevados se consideran como un factor de riesgo para padecer ECV (92).

Tras analizar la seguridad y tolerabilidad de la bebida, analizamos su eficacia sobre el estado inmunológico y antioxidante de las PBMCs de los voluntarios antes de empezar el ensayo y al final del mismo. Tras los 28 días de ingesta, las PBMCs de los participantes poseían una menor capacidad para

producir las citoquinas proinflamatorias IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF tras la estimulación con PHA. En cambio, no se modificaron los niveles de IL-4 e IL-10. Además, el aumento de los ratios IL-4/TNF, IL-10/IFN- $\gamma$  e IL-10/TNF está en consonancia con los resultados obtenidos *in vitro* que muestran el desplazamiento de la respuesta Th1/Th2 hacia un fenotipo antiinflamatorio.

Existen muy pocos estudios clínicos que hayan evaluado hidrolizados proteicos vegetales y en los cuales se estudien los efectos que estos pueden tener sobre la producción de citoquinas en PBMCs. En 2005, un estudio mostró que la ingesta de 3 g diarios, durante seis días, de hidrolizados de gluten de trigo, en 5 voluntarios sanos, era capaz de aumentar la actividad de las células T natural killer (NK) sin describir ningún efecto adverso (93).

También se han estudiado los posibles efectos de la soja y de sus hidrolizados, obtenidos con proteasas alimentarias, en 10 voluntarios sanos para evaluar la función inmune. Los resultados mostraron un aumento en las NK, los M $\phi$  y las células T inmaduras, y una disminución en las células B (94). Por lo tanto, hasta donde llega nuestro conocimiento no existen estudios clínicos con alimentos funcionales vegetales sobre el estado inmunológico de voluntarios sanos tan completos como el realizado en esta tesis doctoral.

Además de las citoquinas, las células inflamatorias pueden liberar moléculas con capacidad oxidante en el sitio de inflamación. Estas moléculas son principalmente ROS, cuya producción aumenta debido a un incremento de la actividad mitocondrial en estas células inflamatorias (30). Una producción

exacerbada de las ROS puede llevar a un daño oxidativo, por lo que un correcto control de éstas permite la supervivencia de las células. Como hemos descrito anteriormente, el  $\bullet\text{OH}$  es la especie reactiva más peligrosa. Su producción excesiva puede provocar graves daños celulares (95). Así, se analizó el estado antioxidante de las PBMCs de los voluntarios tras el tratamiento con la bebida. La ingesta mejoró significativamente el poder antioxidante de las PBMCs evaluado mediante la TAC. Estos hallazgos están en consonancia con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, apoyando, nuevamente, las propiedades beneficiosas de la bebida experimental, generada a partir de los LPHs, sobre la salud humana.

Al igual que en referencia al estatus inmunológico, no conocemos estudios clínicos sobre el estado antioxidante tras un tratamiento con un alimento funcional vegetal.

De especial interés resultaron los efectos de la bebida sobre los marcadores séricos del perfil lipídico. Así, tras los 28 días de ingesta diaria, los voluntarios presentaron una reducción significativa en el índice aterogénico, considerado un importante indicador de una posible ECV (96, 97), con respecto al día 0. Tras segregar los resultados por el sexo de los voluntarios, observamos que el efecto sobre el índice aterogénico se debía a la población masculina, mientras que en los participantes de sexo femenino no se observaron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos del perfil lipídico.

Existen diferentes estudios en humanos que exploran la importancia de las proteínas del altramuze sobre los parámetros lipídicos. En general, entre 25 y 30 g de proteínas del altramuze, integrados en diversos alimentos (barritas, bebidas, etc.), y consumidos a lo largo de 4 semanas, son capaces de disminuir algunos parámetros bioquímicos del perfil lipídico, como el TC y la LDL-C (64, 98-100). Además, otros compuestos vegetales han demostrado poseer un efecto hipocolesterolémico. Por ejemplo, la berberina, un alcaloide que se encuentra en el género *Berberis* spp., es capaz de reducir los parámetros lipídicos mediante la modulación de la expresión génica de algunos genes implicados en mantener niveles normales de TC en el plasma (101). Sin embargo, en otro estudio se ha visto que el consumo de alimentos enriquecidos con altramuze (como pan, pasta y galletas), durante un año, no afecta a los parámetros lipídicos (102).

Dos estudios previos han demostrado que la ingesta, durante cuatro semanas, de barritas o bebidas con proteínas de *L. angustifolius* (la misma materia prima que la usada en el presente estudio) ha sido capaz de disminuir los niveles de TC (103, 104). Además, tras 8 semanas de ingesta de 25 g de proteínas procedente de *L. angustifolius* se observó una disminución del ratio LDL-C/HDL-C (104). En el presente estudio nosotros observamos una disminución significativa del ratio LDL-C/HDL-C con solo 1 g diario de LPHs y durante solo 4 semanas de ingestión.

La hidrólisis de las proteínas genera péptidos de tamaño pequeño que pueden ser absorbidos mejor y que pueden ejercer mejor sus funciones (105).

Así, un estudio reciente, con hidrolizados de altramuza blanca (*L. albus*) obtenidos mediante digestión con tripsina y pepsina, demuestra que éstos interfieren con la síntesis *de novo* del colesterol y aumentan la captación de la LDL-C en un modelo *in vitro* de hepatocitos humanos, utilizando la línea celular HepG2 (106). Además, otros hidrolizados, como los de las proteínas de salvado de arroz o de semilla de cáñamo, son capaces de modificar el contenido de lípidos, disminuyendo el TC y la LDL-C (107, 108). Por estos motivos, consideramos que la hidrólisis enzimática del aislado proteico de *L. angustifolius* con Alcalasa 2.4 L podría haber generado péptidos capaces de ejercer una disminución en el ratio LDL-C/HDL-C.

Otros estudios también han demostrado que, además de los parámetros lipídicos, la ingesta de alimentos enriquecidos con altramuza, durante al menos 16 semanas, son capaces de disminuir la presión sanguínea (102, 109), uno de los factores de disfunción endotelial y, por consiguiente, de riesgo cardiovascular. Por ello, analizamos el perfil lipídico de los participantes masculinos segregados en dos grupos: aquellos que presentaban niveles basales (día 0) de IMC, TC, LDL-C, ratio LDL-C/HDL-C y ratio TC/HDL-C, altos (por encima de la mediana; M2), considerados como indicadores de un posible riesgo cardiovascular (97, 110, 111), y por debajo de la mediana (grupo M1). Resultó muy interesante observar que la ingesta de la bebida redujo los niveles de marcadores lipídicos solo en aquellos hombres del grupo M2 (aquellos con mayor riesgo de padecer ECV). Concretamente, la ingesta de la bebida disminuyó de forma significativa el índice aterogénico con respecto a



los valores basales en el grupo M2 en todos los factores de riesgo considerados. Además, la bebida disminuyó el TC en aquellos hombres con altos valores basales de IMC, TC, LDL-C y de índice aterogénico y también se observó una disminución de los niveles de LDL-C en aquellos hombres con altos niveles basales de LDL-C e índice aterogénico.

Adicionalmente a lo expuesto previamente, la inflamación y el estrés oxidativo también están asociados con el proceso de envejecimiento. De hecho, la pérdida de la capacidad para controlar el estrés oxidativo y el aumento simultáneo en el estado proinflamatorio son características clave del envejecimiento; proceso denominado *inflammaging* (envejecimiento inflamatorio) (112) y está altamente correlacionado con diversas patologías, como la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca, la diabetes tipo II o el cáncer (113).

El objetivo final de la investigación realizada en la presente tesis doctoral es establecer evidencias científicas robustas sobre la bioactividad y las propiedades de estos LPHs para así poder transferir estos conocimientos a las empresas interesadas en el diseño y producción de alimentos biofuncionales (bebidas, geles, snacks, etc.) enfocados en mejorar el bienestar y la calidad de vida de la población humana. Éste es un mercado emergente y en expansión en el que los alimentos están relacionados con la salud y los consumidores han mostrado recientemente un gran interés y demanda en los productos de origen vegetal. Un número cada vez mayor de alimentos

funcionales están enriquecidos con vitaminas, minerales y fibra de las plantas, pero los verdaderos protagonistas de los últimos años son las proteínas. Por esta razón, no solo debe ser clara la bioactividad y la funcionalidad de este producto de proteína, sino también el enfoque tecnológico relacionado con el proceso de producción de estos hidrolizados para facilitar la transferencia de este conocimiento. En este sentido, se han desarrollado diseños simples y eficientes de hidrólisis proteica mediante hidrólisis enzimática con Alcalasa 2.4 L (66).

Aunque estudios previos han sugerido los efectos beneficios para la salud de los derivados de las proteínas de altramuza en condiciones fisiopatológicas, como la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión (69, 114), éste es el primer estudio que muestra la acción de los LPHs, obtenidos mediante proteasas de calidad alimentaria, en respuestas inmunes y oxidativas en células humanas.

En resumen, este estudio clínico es el primero en demostrar que la ingesta diaria durante 4 semanas de un alimento funcional basado en hidrolizados proteicos de altramuza es segura, bien tolerada y eficaz como antiinflamatorio, antioxidante e hipocolesterolemizante. Por lo tanto, esta tesis doctoral muestra que los LPHs pueden representar una opción efectiva en la generación de alimentos funcionales proporcionando nuevas oportunidades para desarrollar estrategias nutricionales con *Lupinus angustifolius* como fuente dietética de proteínas vegetales.



## **7. CONCLUSIONES**

---



**7.1 La administración *in vitro* de los LPHs reduce la proliferación celular de las PBMCs sin presentar efectos citotóxicos.**

**7.2 Los LPHs disminuyen la respuesta Th1 en PBMCs estimulados con PHA y aumentan el balance Th2/Th1.**

**7.3 Los LPHs aumentan la capacidad antioxidante total de las PBMCs a través del aumento en las actividades de las enzimas SOD y CAT.**

**7.4 La ingesta diaria de una bebida experimental a base de los LPHs durante 28 días es segura y bien tolerada.**

**7.5 La ingesta de la bebida experimental disminuye la respuesta Th1 en las PBMCs de los pacientes e inclina el ratio Th1/Th2 hacia fenotipo antiinflamatorio.**

**7.6 La bebida experimental aumenta el estatus antioxidante total en las PBMCs de los participantes en el estudio.**

**7.7 La ingestión de la bebida experimental muestra efectos protectores sobre el perfil lipídico, sobre todo en aquellos varones con altos niveles basales de IMC, TC, LDL-C, ratio LDL-C/HDL-C o ratio TC/HDL-C.**





## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---





1. Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000;71(6):1660S-4S.
2. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol* 2000;11(7):254-62.
3. Kumar R, Jaiswal A, Mann B. Chemical and enzymatic modification of food proteins. Available at: [http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp\\_content/food\\_technology/food\\_chemistry/20.processing\\_induced\\_physical\\_chemical\\_and\\_nutritional\\_changes\\_in\\_food\\_proteins/et/44\\_et\\_m20.pdf](http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/food_technology/food_chemistry/20.processing_induced_physical_chemical_and_nutritional_changes_in_food_proteins/et/44_et_m20.pdf)
4. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(3):597-635.
5. Bryan PN. Protein engineering of subtilisin. *BBA Protein Struct Mol Enzym* 2000;1543(2):203-22.
6. Ahn C-B, Jeon Y-J, Kim Y-T, Je J-Y. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochem* 2012;47(12):2240-5.
7. Siow H-L, Gan C-Y. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chem* 2013;141(4):3435-42.
8. Görtler I, Urbanek R, Forster J. Characterization of antigens and allergens in hypo-allergenic infant formulae. *Eur J Pediatr* 1995;154(4):289-94.
9. Friedman M, Brandon DL. Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem* 2001;49(3):1069-86.
10. Bougle D, Bouhallab S. Dietary Bioactive Peptides: Human Studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015;57(2):335-43.
11. Vernaza MG, Dia VP, de Mejia EG, Chang YK. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chem* 2012;134(4):2217-25.

12. Dandekar A, Mendez R, Zhang K. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. *Methods Mol Biol* 2015;1292:205-14.
13. Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark R, Roy A. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol* 2000;35(5):521-32.
14. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992;18(1):1-29.
15. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: role of chronic inflammation. *Prev Med* 2012;54:S29-S37.
16. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85(1):9-18.
17. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):163-89.
18. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17(25):3261-70.
19. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991;266(12):7313-6.
20. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003; 21(1):425-56.
21. Zhao P, Xiao X, Ghobrial RM, Li XC. IL-9 and Th9 cells: progress and challenges. *Int Immunol* 2013;25(10):547-51.
22. Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol* 2014;35(2):61-8.

23. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT, Hahn BH, Hossain A. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014;13(12):1174-81.
24. Zbikowska-Gotz M, Palgan K, Gawronska-Ukleja E, Kuzminski A, Przybyszewski M, Socha E, Bartuzi Z. Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016;29(1):90-8.
25. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
26. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29:71-109.
27. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, De Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174(4):915-24.
28. Cua DJ, Hutchins B, LaFace DM, Stohlman SA, Coffman RL. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166(1):602-8.
29. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179(5):1517-27.
30. Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system. *Int Rev Immunol* 2013;32(3):249-70.
31. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* 2017;86:715-48.

32. Bowler C, Montagu Mv, Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 1992;43(1):83-116.
33. Percy ME. Catalase: an old enzyme with a new role? *Can J Biochem Cell Biol* 1984;62(10):1006-14.
34. Wendel A. Glutathione peroxidase. Edition ed. *Methods Enzymol*, Elsevier, 1981:325-33.
35. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *BBA-Gen Subj* 2013; 1830(5): 3217-66.
36. Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Varešlija D, Tipton KF. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(12):2067-79.
37. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55-74.
38. Moller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008;47(4):171-82.
39. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40(7):395-405.
40. Lindmark-Mansson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 2000;84 Suppl 1:S103-10.
41. Sylvie F. Gauthier YP, Diane Saint-Sauveur. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J* 2006;16(11):1315-23.
42. Yousr M, Howell N. Antioxidant and ACE Inhibitory Bioactive Peptides Purified from Egg Yolk Proteins. *Int J Mol Sci* 2015;16(12):29161-78.
43. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18(2):163-9.

44. Takahashi M, Moriguchi S, Yoshikawa M, Sasaki R. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin. *Biochem Mol Biol Int* 1994;33(6):1151-8.
45. Arise AK, Alashi AM, Nwachukwu ID, Ijabadeniyi OA, Aluko RE, Amonsou EO. Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions. *Food Funct* 2016;7(5):2431-7.
46. Singh P, Kumar R, Sabapathy S, Bawa A. Functional and edible uses of soy protein products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2008;7(1):14-28.
47. Vasconcellos F, Woiciechowski A, Soccol V, Mantovani D, Soccol C. Antimicrobial and antioxidant properties of-conglycinin and glycinin from soy protein isolate. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2014;3:144-57.
48. Yang HJ, Kwon DY, Kim MJ, Kang S, Park S. Meju, unsalted soybeans fermented with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*, potentiates insulinotropic actions and improves hepatic insulin sensitivity in diabetic rats. *Nutr Metab* 2012;9(1):37.
49. Yang J-H, Mau J-L, Ko P-T, Huang L-C. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem* 2000;71(2):249-54.
50. Rayaprolu SJ, Hettiarachchy NS, Chen P, Kannan A, Mauromostakos A. Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver and lung cancer cell growth. *Food Res Int* 2013;50(1):282-8.
51. Shimakage A, Shinbo M, Yamada S. ACE inhibitory substances derived from soy foods. *J Biol Macromol* 2012;12(3):72-80.
52. Cho S-J, Juillerat MA, Lee C-H. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2007;55(26):10599-604.
53. Kanamoto R, Azuma N, Miyamoto T, Saeki T, Tsuchihashi Y, Iwami K. Soybean resistant proteins interrupt an enterohepatic circulation of bile acids and suppress liver tumorigenesis induced by azoxymethane

- and dietary deoxycholate in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(4):999-1002.
54. Azuma N, Machida K, Saeki T, Kanamoto R, Iwami K. Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000;46(1):23-9.
55. Bounous G, Kongshavn PA. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr* 1982;112(9):1747-55.
56. Mine Y, Kovacs-Nolan J. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *Worlds Poult Sci J* 2006;62:87-95.
57. Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem* 2006;41(2):447-56.
58. Tang C-H, Wang X-S, Yang X-Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem* 2009;114(4):1484-90.
59. Yust MM, Millan-Linares MC, Alcaide-Hidalgo JM, Millan F, Pedroche J. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *J Sci Food Agric* 2012;92(9):1994-2001.
60. Li X-x, Han L-j, Chen L-j. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *J Sci Food Agric* 2008;88(9):1660-6.
61. He R, Girgih AT, Malomo SA, Ju X, Aluko RE. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J Funct Foods* 2013;5(1):219-27.
62. Makahleh A, Saad B, Bari M. Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation. Edtion ed. *Handbook of antioxidants for food preservation*: Elsevier, 2015:51-78.

63. Boschini G, Scigliuolo GM, Resta D, Arnoldi A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chem* 2014;145:34-40.
64. Lammi C, Zannoni C, Ferruzzi S, Ranaldi G, Sambuy Y, Arnoldi A. Hypocholesterolaemic Activity of Lupin Peptides: Investigation on the Crosstalk between Human Enterocytes and Hepatocytes Using a Co-Culture System Including Caco-2 and HepG2 Cells. *Nutrients* 2016;8(7).
65. Millan-Linares MC, Bermudez B, Yust MM, Millan F, Pedroche J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *J Funct Foods* 2014;8:224-33.
66. Millan-Linares MC, Yust MM, Alcaide-Hidalgo JM, Millan F, Pedroche J. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem* 2014;151:141-7.
67. Ware JE, Jr., Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Medical care* 1992;30(6):473-83.
68. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* 2006;16(9):945-60.
69. Lima-Cabello E, Alche V, Foley RC, Andrikopoulos S, Morahan G, Singh KB, Alche JD, Jimenez-Lopez JC. Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) beta-conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. *Mol Nutr Food Res* 2017;61(5).
70. Bellinghausen I, Reuter S, Martin H, Maxeiner J, Luxemburger U, Tureci O, Grabbe S, Taube C, Saloga J. Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(6):1384-93.

71. Jang HH, Cho SY, Kim MJ, Kim JB, Lee SH, Lee MY, Lee YM. Anti-inflammatory effects of *Salvia plebeia* R. Br extract in vitro and in ovalbumin-induced mouse model. *Biol Res* 2016;49(1):41.
72. Fan X, Bai L, Zhu L, Yang L, Zhang X. Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *J Agric Food Chem* 2014;62(38):9211-22.
73. Crowley D, O'Callaghan Y, McCarthy A, Connolly A, Piggott CO, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Immunomodulatory potential of a brewers' spent grain protein hydrolysate incorporated into low-fat milk following in vitro gastrointestinal digestion. *Int J Food Sci Nutr* 2015;66(6):672-6.
74. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17(1-4):1-52.
75. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1):9-18.
76. Lahart N, O'Callaghan Y, Aherne S, O'Sullivan D, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: evaluation using the human jurkat T cell line. *Int Dairy J* 2011;21(10):777-82.
77. Cian RE, López-Posadas R, Drago SR, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF-kappaB, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chem* 2012;134(4):1982-90.
78. Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G, Tosca M. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 2009;64(9):1375-8.
79. Forbes EE, Groschwitz K, Abonia JP, Brandt EB, Cohen E, Blanchard C, Ahrens R, Seidu L, McKenzie A, Strait R, et al. IL-9- and mast cell-



- mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *J Exp Med* 2008;205(4):897-913.
80. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010;9:3.
81. Pan M, Jiang TS, Pan JL. Antioxidant activities of rapeseed protein hydrolysates. *Food Bioprocess Tech* 2011;4(7):1144-52.
82. Siger A, Czubinski J, Kachlicki P, Dwiecki K, Lampart-Szczapa E, Nogala-Kalucka M. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *J Food Compost Anal* 2012;25(2):190-7.
83. Babini E, Tagliazucchi D, Martini S, Dei Piu L, Gianotti A. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chem* 2017;228:186-96.
84. West M, Zimmerman HJ. Serum enzymes in hepatic disease. *Med Clin North Am* 1959;43(2):371-400.
85. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004;279(47):48487-90.
86. Smith WB, Gillis D, Kette FE. Lupin: a new hidden food allergen. 2004.
87. Jappe U, Vieths S. Lupine, a source of new as well as hidden food allergens. *Mol Nutr Food Res* 2010;54(1):113-26.
88. Jimenez-Lopez JC, Foley RC, Brear E, Clarke VC, Lima-Cabello E, Florido JF, Singh KB, Alche JD, Smith PMC. Characterization of narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius* L.) recombinant major allergen IgE-binding proteins and the natural beta-conglutin counterparts in sweet lupin seed species. *Food Chem* 2018;244:60-70.
89. van Kampen V, Sander I, Quirce S, Bruning T, Merget R, Raulf M. IgE sensitization to lupine in bakers - cross-reactivity or co-sensitization to wheat flour? *Int Arch Allergy Immunol* 2015;166(1):63-70.

90. Likert R. A technique for the measurement of attitudes. Arch Psychol 1932.
91. Hu F. Obesity epidemiology: Oxford University Press, 2008.
92. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1990; 322(13):882-9.
93. Horiguchi N, Horiguchi H, Suzuki Y. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. Biosci Biotechnol Biochem 2005;69(12):2445-9.
94. Yimit D, Hoxur P, Amat N, Uchikawa K, Yamaguchi N. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers. Nutr 2012;28(2):154-9.
95. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement1, 2. Free Radic Biol Med 2002;32(11):1102-15.
96. Fernandez ML, Webb D. The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. J Am Coll Nutr 2008;27(1):1-5.
97. Kinoshita B, Glick H, Preiss L, Puder KL. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks in men by changes in levels and ratios. J Investig Med 1995;43(5):443-50.
98. Bahr M, Fechner A, Kiehntopf M, Jahreis G. Consuming a mixed diet enriched with lupin protein beneficially affects plasma lipids in hypercholesterolemic subjects: a randomized controlled trial. Clin Nutr 2015;34(1):7-14.
99. Naruszewicz M, Nowicka G, Klosiewicz-Latoszek L, Arnoldi A, Sirtori C. Effect of lupin protein (Lupinus albus) on cardiovascular risk factors in smokers with mild hypercholesterolemia. Am Heart Assoc, 2006.

100. Weisse K, Brandsch C, Zernsdorf B, Nkengfack Nembongwe GS, Hofmann K, Eder K, Stangl GI. Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol:HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. *Eur J Nutr* 2010;49(2):65-71.
101. Cameron J, Ranheim T, Kulseth MA, Leren TP, Berge KE. Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells. *Atherosclerosis* 2008;201(2):266-73.
102. Belski R, Mori TA, Puddey IB, Sipsas S, Woodman RJ, Ackland TR, Beilin LJ, Dove ER, Carlyon NB, Jayaseena V, et al. Effects of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: a 12-month randomized controlled weight loss trial. *Int J Obes* 2011;35(6):810-9.
103. Sirtori CR, Triolo M, Bosisio R, Bondioli A, Calabresi L, De Vergori V, Gomasaschi M, Mombelli G, Pazzucconi F, Zacherl C, et al. Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. *Br J Nutr* 2012;107(8):1176-83.
104. Bahr M, Fechner A, Kramer J, Kiehntopf M, Jahreis G. Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL cholesterol ratio in hypercholesterolemic adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossover study. *Nutr J* 2013;12:107.
105. Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 1999;60(4):332-7.
106. Lammi C, Zanoni C, Scigliuolo GM, D'Amato A, Arnoldi A. Lupin peptides lower low-density lipoprotein (LDL) cholesterol through an up-regulation of the LDL receptor/sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) pathway at HepG2 cell line. *J Agric Food Chem* 2014;62(29):7151-9.

107. Zhang H, Wang J, Liu Y, Gong L, Sun B. Rice bran proteins and their hydrolysates modulate cholesterol metabolism in mice on hypercholesterolemic diets. *Food Funct* 2016;7(6):2747-53.
108. Zanoni C, Aiello G, Arnoldi A, Lammi C. Hempseed Peptides Exert Hypocholesterolemic Effects with a Statin-Like Mechanism. *J Agric Food Chem* 2017;65(40):8829-38.
109. Lee YP, Mori TA, Puddey IB, Sipsas S, Ackland TR, Beilin LJ, Hodgson JM. Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. *Am J Clin Nutr* 2009;89(3):766-72.
110. Lemieux I, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Cantin B, Bergeron J, Dagenais GR, Despres JP. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2001;161(22):2685-92.
111. Dudina A, Cooney MT, Bacquer DD, Backer GD, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Menotti A, Njolstad I, Oganov R, et al. Relationships between body mass index, cardiovascular mortality, and risk factors: a report from the SCORE investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18(5):731-42.
112. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-54.
113. Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, Wan W, Tai X. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016;2016:8426874.
114. Arnoldi A, Boschini G, Zanoni C, Lammi C. The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. *J Funct Foods* 2015; 18(Part A):550-63.




## **9. ANEXOS**

---



**Anexo 1. Informes del Comité de Ética de la Investigación del HUVR (A) y del Comité Ético de Experimentación de la US (B).**




Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

**INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U.  
VIRGEN DEL ROCIO**

El Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen del Rocio de Sevilla, en Sesión celebrada el día treinta de octubre de dos mil doce (Acta 09/12):

1. Ha procedido a la revisión del estudio:
  - Código de CEI 2012PI/200
  - Presentado por D. Antonio Carrillo Vico
  - Titulado "Valoración de los efectos saludables de péptidos bioactivos vegetales: efectos inmunomoduladores, antioxidantes y metabólicos"
2. Tras su valoración procede a emitir **INFORME FAVORABLE** del mismo.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se expide la presente certificación en Sevilla, a nueve de noviembre de dos mil doce



Fdo.: Javier Bautista Paloma  
Presidente

Hospital Universitario VIRGEN DEL ROCIO  
AVDA. MANUEL SIUROT S/N - 41013 - SEVILLA

A.



A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “Valoración de los efectos saludables de hidrolizados proteicos vegetales: efectos inmunomoduladores, antioxidantes y metabólicos” presentado por D. Antonio Carrillo Vico emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 12 de febrero de 2012.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández.

B.



## Anexo 2. Dictamen favorable para el estudio con voluntarios humanos (Lupine-1) aprobado por el Comité Ético de la Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío.



### Informe Dictamen Protocolo Favorable Otros Estudios

C.P. Lupine-1 - C.I. 2015/110

28 de mayo de 2015

CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

Dr. Víctor Sánchez Margalet  
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

#### CERTIFICA

Que el CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío en su reunión del día 28/04/2015, acta 04/2015 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** Estudio clínico para valorar los efectos inmunomoduladores y antioxidantes de una bebida basada en hidrolizados proteicos de altramuiz en voluntarios sanos

**Código Promotor:** Lupine-1 **Código Interno:** 2015/110

**Promotor:** Universidad de Sevilla

**Versión Protocolo Evaluada:** Versión 2.0, 05 de MAYO de 2015

**Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:** HIP/CI / Versión 5 de mayo de 2015

#### 1º. Considera que

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado

2º. Por lo que este CEI emite un **DICTAMEN FAVORABLE**, y acepta que dicho estudio sea realizado por el **Dr. Antonio Carrillo Vico**.

Lo que firmo en Sevilla, a 28 de mayo de 2015

Fdo:

NOMBRE  
SANCHEZ  
MARGALET  
VICTOR MANUEL  
- NIF 28691159Q

Firmado digitalmente por NOMBRE  
SANCHEZ MARGALET VICTOR  
MANUEL - NIF 28691159Q  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=es, o=FNMT, ou=fnmt dsae 2 ca,  
ou=703002447, cn=NOMBRE  
SANCHEZ MARGALET VICTOR  
MANUEL - NIF 28691159Q  
Fecha: 2015.05.28 09:20:46 +02'00'

Dr. Víctor Sánchez Margalet  
Presidente del CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío

**Anexo 3. Cuestionario SF-36 proporcionado a los voluntarios del ensayo Lupine-1.**

<b>CUESTIONARIO DE SALUD SF-36</b>
------------------------------------

ESTUDIO CLÍNICO PARA VALORAR LOS EFECTOS  
INMUNOMODULADORES Y ANTIOXIDANTES DE UNA BEBIDA  
BASADA EN HIDROLIZADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ EN  
VOLUNTARIOS SANOS (Lupine-1)

FECHA: |\_\_|\_|-|\_\_\_\_\_|-|\_\_\_\_\_|

CÓDIGO VOLUNTARIO: |\_\_|\_|\_|

**INSTRUCCIONES:**

Las preguntas que siguen se refieren a lo que usted piensa sobre su salud. Sus respuestas permitirán saber cómo se encuentra usted y hasta qué punto es capaz de hacer sus actividades habituales

Conteste cada pregunta tal como se indica. Si no está seguro/a de cómo responder a una pregunta, por favor conteste lo que le parezca más cierto.

## MARQUE UNA SOLA RESPUESTA

1. En general, usted diría que su salud es:

- 1 ☐ Excelente
- 2 ☐ Muy buena
- 3 ☐ Buena
- 4 ☐ Regular
- 5 ☐ Mala

2. ¿Cómo diría que es su salud actual, comparada con la de hace un año?

- 1 ☐ Mucho mejor ahora que hace un año
- 2 ☐ Algo mejor ahora que hace un año
- 3 ☐ Más o menos igual que hace un año
- 4 ☐ Algo peor ahora que hace un año
- 5 ☐ Mucho peor ahora que hace un año

LAS SIGUIENTES PREGUNTAS SE REFIEREN A ACTIVIDADES O COSAS  
QUE USTED PODRÍA HACER EN UN DÍA NORMAL.

3. Su salud actual, ¿le limita para hacer esfuerzos intensos, tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

4. Su salud actual, ¿le limita para hacer esfuerzos moderados, como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de una hora?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

5. Su salud actual, ¿le limita para coger o llevar la bolsa de la compra?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

6. Su salud actual, ¿le limita para subir varios pisos por la escalera?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

7. Su salud actual, ¿le limita para subir un solo piso por la escalera?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

8. Su salud actual, ¿le limita para agacharse o arrodillarse?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

9. Su salud actual, ¿le limita para caminar un kilómetro o más?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

10. Su salud actual, ¿le limita para caminar varias manzanas (varios centenares de metros)?

- 1 ☐ Sí, me limita mucho
- 2 ☐ Sí, me limita un poco
- 3 ☐ No, no me limita nada

11. Su salud actual, ¿le limita para caminar una sola manzana (unos 100 metros)?

1 ☐ Sí, me limita mucho

2 ☐ Sí, me limita un poco

3 ☐ No, no me limita nada

12. Su salud actual, ¿le limita para bañarse o vestirse por sí mismo?

1 ☐ Sí, me limita mucho

2 ☐ Sí, me limita un poco

3 ☐ No, no me limita nada

LAS SIGUIENTES PREGUNTAS SE REFIEREN A PROBLEMAS  
EN SU TRABAJO O EN SUS ACTIVIDADES COTIDIANAS.

13. Durante las 4 últimas semanas, ¿tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

14. Durante las 4 últimas semanas, ¿hizo menos de lo que hubiera querido hacer, a causa de su salud física?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

15. Durante las 4 últimas semanas, ¿tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

16. Durante las 4 últimas semanas, ¿tuvo dificultad para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas (por ejemplo, le costó más de lo normal), a causa de su salud física?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

17. Durante las 4 últimas semanas, ¿tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

18. Durante las 4 últimas semanas, ¿hizo menos de lo que hubiera querido hacer, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

19. Durante las 4 últimas semanas, ¿no hizo su trabajo o sus actividades cotidianas tan cuidadosamente como de costumbre, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido, o nervioso)?

1 ☐ Sí

2 ☐ No

20. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

1 ☐ Nada

2 ☐ Un poco

3 ☐ Regular

4 ☐ Bastante

5 ☐ Mucho

21. ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

1 ☐ No, ninguno

2 ☐ Sí, muy poco

3 ☐ Sí, un poco

4 ☐ Sí, moderado

5 ☐ Sí, mucho

6 ☐ Sí, muchísimo

22. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

1 ☐ Nada

2 ☐ Un poco

3 ☐ Regular

4 ☐ Bastante

5 ☐ Mucho

LAS PREGUNTAS QUE SIGUEN SE REFIEREN A CÓMO SE HA SENTIDO Y CÓMO LE HAN  
IDO LAS COSAS DURANTE LAS 4 ÚLTIMAS SEMANAS. EN CADA PREGUNTA RESPONDA  
LO QUE SE PAREZCA MÁS A CÓMO SE HA SENTIDO USTED.

23. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió lleno de vitalidad?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

24. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo estuvo muy nervioso?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

25. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió tan bajo de moral que nada  
podía animarle?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

26. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió calmado y tranquilo?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

27. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo tuvo mucha energía?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

28. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió desanimado y triste?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca



29. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió agotado?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

30. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió feliz?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

31. Durante las 4 últimas semanas, ¿cuánto tiempo se sintió cansado?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Muchas veces
- 4 ☐ Algunas veces
- 5 ☐ Sólo alguna vez
- 6 ☐ Nunca

32. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

- 1 ☐ Siempre
- 2 ☐ Casi siempre
- 3 ☐ Algunas veces
- 4 ☐ Sólo alguna vez
- 5 ☐ Nunca

POR FAVOR, DIGA SI LE PARECE CIERTA O FALSA  
CADA UNA DE LAS SIGUIENTES FRASES.

33. Creo que me pongo enfermo más fácilmente que otras personas.

- 1 ☐ Totalmente cierta
- 2 ☐ Bastante cierta
- 3 ☐ No lo sé
- 4 ☐ Bastante falsa
- 5 ☐ Totalmente falsa

34. Estoy tan sano como cualquiera.

- 1 ☐ Totalmente cierta
- 2 ☐ Bastante cierta
- 3 ☐ No lo sé
- 4 ☐ Bastante falsa
- 5 ☐ Totalmente falsa

35. Creo que mi salud va a empeorar.

1 ☐ Totalmente cierta

2 ☐ Bastante cierta

3 ☐ No lo sé

4 ☐ Bastante falsa

5 ☐ Totalmente falsa

36. Mi salud es excelente.

1 ☐ Totalmente cierta

2 ☐ Bastante cierta

3 ☐ No lo sé

4 ☐ Bastante falsa

5 ☐ Totalmente falsa

## Anexo 4. Encuesta de satisfacción proporcionada a los voluntarios del ensayo Lupine-1.

ESTUDIO CLÍNICO PARA VALORAR LOS EFECTOS INMUNOMODULADORES Y ANTIOXIDANTES DE UNA BEBIDA BASADA EN HIDROLIZADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ EN VOLUNTARIOS SANOS

**CUESTIONARIO DE SATISFACCIÓN**

1. ¿Es la primera vez que participa en un ensayo clínico? ☐ Sí ☐ No

Si ha participado previamente en un ensayo clínico, ¿cuál era la temática?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿Qué opinión le merece nuestro ensayo clínico en comparación con el ensayo clínico previo en el que participó?

☐ Mejor ☐ Igual ☐ Peor

2. Con respecto a las molestias ocasionadas por el estudio:

¿Tuvo dificultades para llegar al centro (IBiS)? ☐ Sí ☐ No

Aproximadamente, ¿cuánto tiempo le llevó llegar al centro (IBiS)? \_\_\_\_\_

3. Con respecto a la información recibida:

¿Considera que fue adecuada? ☐ Sí ☐ No

¿Sus dudas fueron contestadas adecuadamente? ☐ Sí ☐ No

¿Tuvo alguna dificultad para comunicarse con el equipo investigador? ☐ Sí ☐ No

4. Respecto a las visitas:

¿Considera que recibió el recordatorio de cada visita con suficiente antelación? ☐ Sí ☐ No

¿Qué le pareció el horario de la visita (considerando que debía asistir en ayunas)?

☐ Temprano ☐ Adecuado ☐ Tardío

¿Qué opina sobre la duración de las visitas? ☐ Larga ☐ Adecuada ☐ Corta

¿Considera que la atención fue adecuada? ☐ Sí ☐ No

¿Considera que las aulas eran adecuadas? ☐ Sí ☐ No

¿Tuvo alguna molestia como resultado de la extracción de sangre? ☐ Sí ☐ No

Lupine-1| CUESTIONARIO DE SATISFACCIÓN
1 de 2

**5. Sobre este ensayo clínico en general:**

¿Le resultó de interés?

☐ Sí☐ No

¿Participaría en otro ensayo clínico?

☐ Sí☐ No¿Cómo valoraría este ensayo clínico entre **0** (nada satisfecho) y **10** (muy satisfecho)? \_\_\_\_\_